



T.C.
BATMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

BAZI YENİ HİDRAZON TÜREVLERİNİN
SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE
KARBONİK ANHİDRAZ VE KOLİNESTERAZ
ENZİM İNHİBİSYON AKTİVİTELERİNİN
İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Berna AKIŞ

Danışman
Doç. Dr. Reşit ÇAKMAK

Ocak-2024
BATMAN
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Berna AKIŞ tarafından hazırlanan “Bazı Yeni Hidrazon Türevlerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Karbonik Anhidraz ve Kolinesteraz Enzim İnhibisyon Aktivitelerinin İncelenmesi” adlı tez çalışması 25.01.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Batman Üniversitesi Lisansüstü Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Mehmet BOĞA

Danışman

Doç. Dr. Reşit ÇAKMAK

Üye

Doç. Dr. Selami ERCAN

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Dr. Öğr. Üyesi Ömer Murat ÖTER
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

*Bu tez çalışması Batman Üniversitesi-Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından .22.001 nolu proje ile desteklenmiştir.

**Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK bu tez çalışmasının ikinci danışmanıdır.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Berna AKIŞ

25.01.2024

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI YENİ HİDRAZON TÜREVLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE KARBONİK ANHİDRAZ VE KOLİNESTERAZ ENZİM İNHİBİSYON AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Berna AKIŞ

Batman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Reşit ÇAKMAK
İkinci Danışman: Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK

2024, 55 Sayfa

Jüri

Danışman: Doç. Dr. Reşit ÇAKMAK
Prof. Dr. Mehmet BOĞA
Doç. Dr. Selami ERCAN

İnsan karbonik anhidraz I ve II izoenzimleri (hCA I ve II) ve kolinesteraz enzimleri, yani asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BChE), çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerle yakından ilişkili önemli metabolik enzimlerdir. Bu çalışmada, hidrazon ve sülfonat grupları içeren bazı yeni hibrit moleküllerin (2a-g) hCA I, hCA II, AChE ve BChE'ye karşı inhibisyon aktivitesini araştırdık. Hibrit moleküllerin kimyasal yapıları elementel analiz ve bazı spektroskopik tekniklerle karakterize edildi. Test edilen tüm hibrit bileşikler, hCA I'e karşı 30.4 ila 264.0 nM, hCA II'ye karşı 23.2 ila 251.6 nM, AChE'ye karşı 12.1 ila 114.3 nM ve BChE'ye karşı 76.4 ila 134.0 nM aralığında IC₅₀ değerleriyle düşük nanomolar inhibisyon gösterdi. Bu bileşikler, hCA I ve AChE'yi referans moleküller olan asetazolamid (AZA) ve neostigmin'den daha fazla inhibe etti. Test edilen bileşikler arasında 2c ve 2e bileşiklerinin bu enzimlere karşı en iyi inhibitör olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Hidrazon, karbonik anhidraz inhibitörü, kolinesteraz inhibitörü.

ABSTRACT

MS THESIS

Berna AKIŞ

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION OF SOME NEW HYDRAZONE DERIVATIVES AND INVESTIGATION OF THEIR CARBONIC ANHYDRASE AND CHOLINESTERSE ENZYME INHIBITION ACTIVITIES

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Reşit ÇAKMAK
Second Advisor: Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK
2024, 55 Pages

Jury

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Reşit ÇAKMAK
Prof. Dr. Mehmet BOĞA
Assoc. Prof. Dr. Selami ERCAN

Human carbonic anhydrase I and II isoenzymes (hCA I and II) and cholinesterase enzymes, namely acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) are important metabolic enzymes closely associated with various physiological and pathological processes. In this study, we investigated the inhibitory action of some novel hybrid molecules containing hydrazone and sulfonate moieties, namely novel hydrazone derivatives (**2a-g**) based on aryl sulfonate compounds (**1a-g**), against selected metabolic enzymes including hCA I, hCA II, AChE and BChE. The chemical structures of hybrids were characterized by elemental analysis and some spectroscopic techniques. All tested hybrid compounds showed low nanomolar inhibition with IC₅₀ values of in the range of 30.4 to 264.0 nM against hCA I, 23.2 to 251.6 nM against hCA II, 12.1 to 114.3 nM against AChE, and 76.4 to 134.0 nM against BChE. These compounds inhibited hCA I and AChE more than reference molecules acetazolamide (AZA) and neostigmine. Among the tested compounds, compounds **2c** and **2e** were determined to be the best inhibitors against these enzymes.

Keywords: Hydrazone, carbonic anhydrase inhibitor, cholinesterase inhibitor.

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım süresince, benden yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Reşit ÇAKMAK'a, ve ikinci danışman hocam Sayın Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK'e

Tezin yazım aşamasındaki her türlü desteği için değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Eyüp BAŞARAN'a ve deneysel çalışmalarımıdaki desteklerinden dolayı değerli hocam Sayın Doç. Dr. Ercan ÇINAR'a

Tez çalışması boyunca desteklerinden dolayı Batman Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Abdulkadir LEVENT'e ve diğer öğretim üyelerine,

Yüksek lisans tezimin savunmasında bulunan tez jüri üyelerine,

FT-IR spektrumlarının alınmasında yardımcı olan Dicle Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Mehmet BOĞA'ya,

Tezimin deneysel çalışmalarını yapmam için laboratuvarlarında çalışmama izin veren Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojileri Bölüm Başkanlığı'na,

Her zaman yanımda olan ve eğitim hayatım boyunca maddi manevi desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen sevgili aileme ve eşime teşekkürlerimi sunarım.

Berna AKIŞ

BATMAN-2024

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
3. MATERYAL VE METOTLAR	7
3.1. Materyal.....	7
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	7
3.1.2. İnce Tabaka Kromatografisi ile Reaksiyon Takibi	7
3.1.3. Kullanılan Cihazlar ve Yapılan Analizler.....	8
3.2. Metotlar	9
3.2.1. Aril Sülfonat Bileşiklerin Sentezi için Genel Prosedür	9
3.2.2. Hidrazon Bileşiklerin Sentezi için Genel Prosedür	9
3.2.4. İnsan Karbonik Anhidraz Enzimlerinin İnhibisyon Çalışmaları	11
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	13
4.1. Sentez ve Karakterizasyon	13
4.2. Yeni Sentezlenen Moleküller ve Analiz Sonuçları	15
4.2.1. 2-((2-(4-Florobenzoil)hidrazono)metil)fenil 4-metoksibenzensülfonat (2a)	15
4.2.2. 3-((2-(4-Florobenzoil)hidrazono)metil)fenil 4-metoksibenzensülfonat (2b)	18
4.2.3. 4-((2-(4-Florobenzoil)hidrazono)metil)fenil 4-metoksibenzensülfonat (2c)	20
4.2.4. 2-((2-(4-Florobenzoil)hidrazono)metil)-5-metoksifenil 4-metoksibenzensülfonat (2d)	23

4.2.5. 4-((2-(4-Florobenzoil)hidrazono)metil)-2-metoksifenil 4-metoksibenzensülfonat (2e)	25
4.2.6. 5-(Dietilamino)-2-((2-(4-florobenzoil)hidrazono)metil)fenil 4-metoksibenzensülfonat (2f).....	28
4.2.7. 1-((2-(4-Florobenzoil)hidrazono)metil)naftalen-2-il 4-metoksibenzensülfonat (2g).....	30
4.3. Biyolojik Aktivite Çalışmalarının Sonuçları	33
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	36
5.1. Sonuçlar	36
5.2. Öneriler	36
6. KAYNAKLAR	37

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Yeni hibrit moleküllerin genel yapısı	2
Şekil 2.1. Fluoksetin ve Efavirenz'in moleküler yapıları	5
Şekil 4.1. Yeni hidrazon bileşiklerinin sentezi	14
Şekil 4.2. Bileşik 2a'nın kimyasal yapısı	15
Şekil 4.3. Bileşik 2a'nın FT-IR spektrumu	16
Şekil 4.4. Bileşik 2a'nın ¹ H NMR spektrumu	17
Şekil 4.5. Bileşik 2a'nın ¹³ C NMR spektrumu	17
Şekil 4.6. Bileşik 2b'nin kimyasal yapısı	18
Şekil 4.7. Bileşik 2b'nin FT-IR spektrumu	19
Şekil 4.8. Bileşik 2b'nin ¹ H NMR spektrumu	19
Şekil 4.9. Bileşik 2b'nin ¹³ C NMR spektrumu	20
Şekil 4.10. Bileşik 2c'nin kimyasal yapısı	20
Şekil 4.11. Bileşik 2c'nin FT-IR spektrumu	21
Şekil 4.12. Bileşik 2c'nin ¹ H NMR spektrumu	22
Şekil 4.13. Bileşik 2c'nin ¹³ C NMR spektrumu	22
Şekil 4.14. Bileşik 2d'nin kimyasal yapısı	23
Şekil 4.15. Bileşik 2d'nin FT-IR spektrumu	24
Şekil 4.16. Bileşik 2d'nin ¹ H NMR spektrumu	24
Şekil 4.17. Bileşik 2d'nin ¹³ C NMR spektrumu	25
Şekil 4.18. Bileşik 2e'nin kimyasal yapısı	25
Şekil 4.19. Bileşik 2e'nin FT-IR spektrumu	26
Şekil 4.20. Bileşik 2e'nin ¹ H NMR spektrumu	27
Şekil 4.21. Bileşik 2e'nin ¹³ C NMR spektrumu	27
Şekil 4.22. Bileşik 2f'nin kimyasal yapısı	28
Şekil 4.23. Bileşik 2f'nin FT-IR spektrumu	29
Şekil 4.24. Bileşik 2f'nin ¹ H NMR spektrumu	29
Şekil 4.25. Bileşik 2f'nin ¹³ C NMR spektrumu	30
Şekil 4.26. Bileşik 2g'nin kimyasal yapısı	30
Şekil 4.27. Bileşik 2g'nin FT-IR spektrumu	31
Şekil 4.28. Bileşik 2g'nin ¹ H NMR spektrumu	32
Şekil 4.29. Bileşik 2g'nin ¹³ C NMR spektrumu	32
Şekil 4.30. hCA I ve AChE enzimine karşı en iyi aktivite gösteren bileşiğin (2e) yapısı	34

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 4. 1. Enzim inhibisyon sonuçları	33
Tablo 4. 2. Bazı sülfonamit ve hidrazon türevlerinin hCA I ve AChE enzimlerine karşı inhibisyon profillerinin karşılaştırılması.....	35

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

δ	Kimyasal kayma
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad
g	Gram
J	Etkileşme sabiti
$\bar{\nu}_{\text{maks}}$	Maksimum dalga sayısı
mg	Miligram
mL	Mililitre
mmol	Milimol

Kısaltmalar

^{13}C NMR	Karbon 13 nükleer manyetik rezonans
^1H NMR	Proton nükleer manyetik rezonans
d	Dublet
dd	Dubletin dubleti
DMSO- d_6	Döterodimetilsülfoksit
E.n.	Erime noktası
FT-IR	Fourier transform infrared
HCl	Hidroklorik asit
Hz	Hertz
MHz	Megahertz
m	Multiplet
ppm	Milyonda bir
s	Singlet
t	Triplet
hCAs	Karbonik anhidraz enzimleri
hCA I	İnsan karbonik anhidraz izoenzimi I
hCA II	İnsan karbonik anhidraz izoenzimi II
AChE	Asetilkolinesteraz
BChE	Butirilkolinesteraz
DTNB	5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)

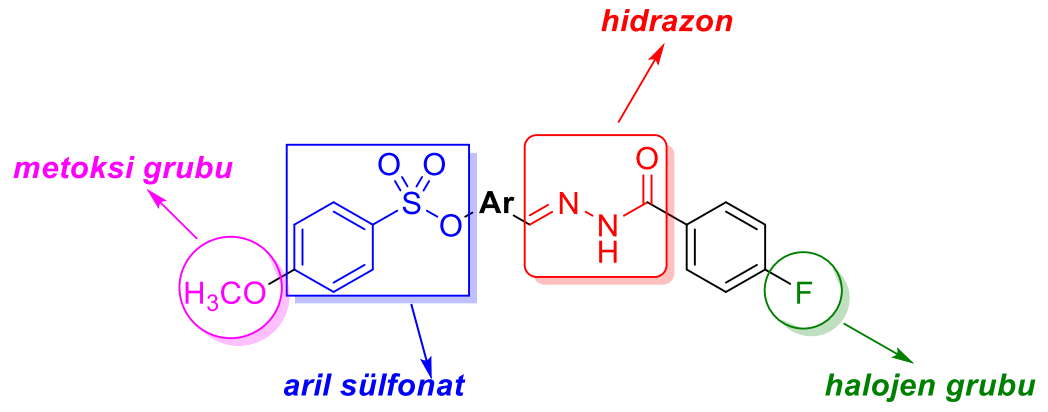
AZA	Asetazolamid
IC ₅₀	Enzimin %50'sini inhibe eden inhibitörün molar konsantrasyonu
TRIS	Tris(hidroksimetil)aminometan
4-FBH	4-Florobenzoik hidrazit
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
KH ₂ PO ₄	Potasyum fosfat monobazik

1. GİRİŞ

Günümüzde kanser, glokom ve Alzheimer gibi bazı hastalıkların tedavi süreçlerinde kullanılan ilaçların istenilen etkiyi göstermemeleri ve çeşitli yan etkiler göstermeleri nedeniyle daha etkili ve yeni ilaçların keşif çalışmaları devam etmektedir. Bu amaçla, yeni hibrit moleküller sentezlenmekte ve bu moleküllerin *in vitro* şartlarda biyolojik aktiviteleri incelenerek yeni ilaç adaylarının belirlenmesine çalışılmaktadır (Çınar ve ark., 2021; Başaran ve ark. 2022, Kamalı ve ark. 2022; Çakmak ve ark. 2021). Bu tez çalışması, bu konuda devam eden araştırmalara katkı sunmak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Yeni inhibitörlerin sentezlenmesi amacıyla günümüzde organik kimyada çeşitli bileşik sınıfları kullanılmaktadır. Hidrazon bileşikler de bu bileşik sınıflarından birini oluşturmaktadır. Bu bileşikler, kendine özgü yapısal özellikleri ve geniş biyolojik aktiviteleri nedeniyle ilaç kimyasında büyük bir öneme sahiptirler (Kamalı ve ark. 2022; Akocak ve ark. 2019; Quinn ve ark. 2003; Hajhashemi ve ark. 2010; Çakmak ve ark. 2022; Elassar ve ark. 2007; Dhainaut ve ark. 2000; El-Etrawy ve ark. 2021).

Bu tez çalışmasında, glokom ve Alzheimer gibi bazı hastalıkların tedavi süreçlerinde kullanmak için yeni ve güçlü metabolik enzim inhibitörlerini keşfetmek amacıyla yeni hibrit moleküllerin (2a-g) sentezlenmesini ve hCA I, hCA II, AChE ve BChE enzimlerine karşı inhibisyon potansiyellerinin incelenmesini amaçladık. Bu amaçla, Şekil 1'de gösterilen biyolojik olarak aktif dört temel yapısal motifi (flor atomu, metoksi grubu, aril sülfonat ve hidrazon kısımları) içeren yeni hibrit molekülleri tasarladık ve başarıyla sentezledik. Yeni moleküller, daha önce sentezlenen ve karakterize edilen aril sülfonat esterlerin 4-florobenzoik hidrazit (4-FBH) ile reaksiyonuyla kolayca sentezlendi. Yeni hibrit moleküller, element analizi ve bazı spektral tekniklerle (FT-IR, ¹H NMR ve ¹³C NMR) spektroskopik olarak karakterize edildi. Daha sonra, bu yeni inhibitör adaylarının bu metabolik enzimlere karşı aktiviteleri literatürde bilinen yöntemlerle belirlendi. Bildiğimiz kadarıyla bu tez, hedef moleküllerin sentezi ve biyolojik aktivitelerinin değerlendirilmesini içeren ilk çalışmadır.



Şekil 1.1. Yeni hibrit moleküllerin genel yapısı

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Karbonik anhidraz enzimleri (hCAs, EC 4.2.1.1) ökaryotik ve prokaryotik hücrelerde yaygın olarak bulunan enzimlerdir. Bu enzimler CO_2 'nin HCO_3^- ve H^+ 'ya dönüşümünü katalize eden çinko içeren metalloenzimlerdir (Alterio ve ark., 2012; Boztaş ve ark., 2015; Çakmak ve ark., 2022; Başaran ve ark., 2022). Bu enzimler solunum, sıvı sekresyonu, asit/baz dengesi, çeşitli doku ve organlarda elektrolit sekresyonu, kalsifikasyon, kemik rezorpsiyonu, CO_2 ve bikarbonatın metabolize eden dokular ve akciğerler arasında taşınması gibi çeşitli fizyolojik süreçlerdeki işlevleri yerine getirirler (El-Malah ve ark., 2023; Gokcen ve ark., 2016).

Karbonik anhidraz gen ailesi α , β , γ , δ , ζ , η ve θ isimli yedi üyeden oluşur (Çakmak ve ark., 2022; Gokcen ve ark., 2016; Perfetto ve ark., 2017). Birçok organizmada, birden fazla gen ailesi olmasına rağmen insan karbonik anhidrazı yalnızca α -CA gen ailesi tarafından kodlanır (Köksal ve ark., 2019). Bugüne kadar bu enzimlerin memelilerde tanımlanmış on altı farklı izoenzimi belirlenmiştir (Çakmak ve ark., 2022; Başaran ve ark., 2022; Gokcen ve ark., 2016; Köksal ve ark., 2019). Bu enzimler arasında en yaygın olanı olan hCA II genel olarak çok sayıda farklı metabolik süreçte yer almaktadır. Bu enzimlerden bir diğeri olan hCA I eritrositlerde hCA II'den beş ila altı kat daha fazla miktarda olsa da, hCA II'nin spesifik aktivitesi çok daha fazladır ve aynı koşullar altında ikisinin toplam CO_2 hidrataz aktivitesine katkısı yaklaşık olarak eşittir (Sundaram ve ark., 1986). hCA I ve hCA II bugüne kadar üzerinde en çok araştırma yapılan izoenzimlerdir (Köksal ve ark., 2019). Öte yandan, bu enzimlerin çok sayıda hastalıkla ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar yayımlanmıştır. Birçok çalışmada, bu enzimlerin inhibitörlerinin glokom, kanser, obezite, osteoporoz ve epilepsi gibi bir dizi bozukluğun tedavisi için inhibe edici/aktive edici potansiyele sahip önemli terapötik hedefler olduğunu bildirmiştir (Çakmak ve ark., 2022; Başaran ve ark., 2022; Mohamed ve ark., 2017; Özil ve ark., 2019).

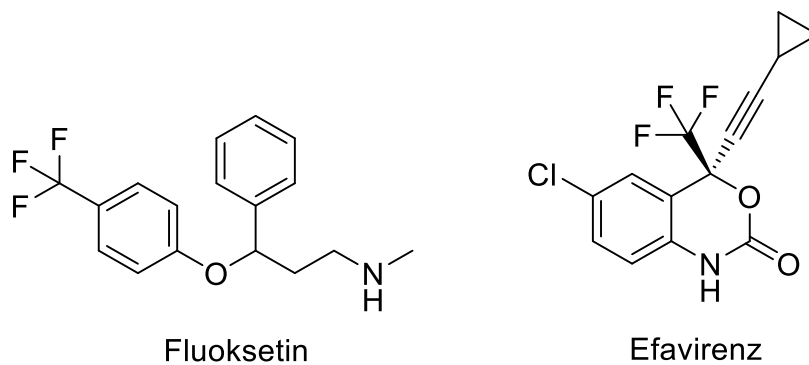
Alzheimer hastalığı, beynin hipokampus ve korteks bölgelerinde geri dönüşümsüz nöron kaybıyla ortaya çıkan, geri dönüşü olmayan ve ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Yaş ilerledikçe hastalığın prevalansı ve sıklığı artmaktadır (Esmer ve ark., 2022; Kamalı ve ark., 2022; Parlar ve ark., 2023; Coşar ve ark., 2023). Serebral kortekste kolinerjik hasar, bu hastalıkta gelişen bilişsel ve davranışsal bozukluklara neden olur (Geula ve Mesulam, 1989; Orta-Salazar ve ark., 2014). Alzheimer hastalığının

semptomları hafıza kaybı, konuşma, karar verme, düşünme ve yorumlama güçlükleri, kişilik ve davranış bozuklukları ile karakterizedir (Irish ve Piolino, 2016; Edvardsson ve ark., 2008). Hastalığın nedeni henüz tam olarak bilinmemekle birlikte yapılan araştırmalar, ailede Alzheimer öyküsü olanlarda bu hastalığa yakalanma riskinin biraz daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur (Katzman ve Saitoh, 1991; . Chun ve ark., 1994; Dezonne ve ark., 2023). Diğer hastalıklara kıyasla son yıllarda üzerinde en çok araştırma yapılan hastalıklardan biri olmasına rağmen, hastalığı önlemenin yolları, kesin tanı testleri veya etkili bir tedavisi henüz bulunamamıştır (Li ve ark., 2023; Tzioras ve ark., 2023). Hastalığın patolojisi incelendiğinde, beyindeki nöron hücrelerinde, hiperfosforile tau proteinlerinden kaynaklanan hücre içi nörofibriler ağlarda ve hücre dışı amiloid β -peptid agregatlarında bozulmalar olduğu görülmektedir (Jaberi ve Fahnestock, 2023; Penke ve ark., 2023). Hastalığın oluşumunun biyolojik mekanizmasının son derece karmaşık olması ve hastalığın nöropatolojisinde birçok faktörün yer alması, hastalığın oluşumunu önlemek, hastalığın seyrini yavaşlatmak ve tedavi etmek için farklı stratejilerin kullanılmasını gerektirmektedir (Devi ve ark., 2023; Trejo-Lopez ve ark., 2022). Hastalığın tedavisinde genel yaklaşım amiloid β -peptid kaynaklı plak oluşumunu önlemek olsa da kolinesteraz inhibitörleri son yıllarda sıklıkla kullanılan tedavi stratejilerinden biridir (Çakmak ve ark., 2022; Başaran ve ark., 2022, Esmer ve ark., 2022; parlar ve ark., 2023; Valls-Comamala ve ark., 2017; Doraiswamy, 2002). Klinik çalışmalar, kolinesteraz inhibitörlerinin hastalığın tedavisinde kullanımının palyatif olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, çalışmalar sıklıkla hem amiloid plak oluşumunu bozan hem de kolinesteraz inhibitör davranışı sergileyen çift yönlü etkili inhibitörlerin geliştirilmesine odaklanmaktadır (Musial ve ark., 2007; Villarroja ve ark., 2004).

Sülfonamit grubu taşıyan bileşikler çinko bağlama özellikleri nedeniyle karbonik anhidraz enzimlerinin inhibisyonu için kullanılan en önemli ve en etkili bileşik sınıfıdır (Köksal ve ark., 2019; Kılıçaslan ve ark., 2016; Gçöer ve ark. 2017). Sülfonamitlerin, 1954'ten bu yana klinik tıpta kullanılan güçlü karbonik anhidraz inhibitörleri olduğu bilinmektedir (Durgun ve ark., 2015). Sülfonamit bazlı karbonik anhidraz inhibitörleri klinik olarak glokom, epilepsi, kanser, obezite ve ülserleri tedavi etmek için kullanılmaktadır (Köksal ve ark., 2019). Öte yandan, farklı bileşik sınıflarına ait olan ve muhtemelen tıbbi kimyanın ilgisini çeken hCAs için seçicilik gösteren sülfonamit olmayan karbonik anhidraz inhibitörleri üzerinde araştırmalar da devam etmektedir (Işık ve ark., 2015).

Günümüzde, yeni ve güçlü biyoaktif moleküllerin tasarımında ve sentezinde kullanılan organik bileşik sınıflarından biri hidrazon türevleridir. Süstitüe hidrazin/hidrazidler ile aldehit ve keton gibi karbonil bileşiklerin kondensasyon reaksiyonu ile sentezlenen bu bileşikler, α -amilaz (Duhan ve ark., 2022), antikanser (Çakmak ve ark., 2022; Zhang ve ark., 20212), antimikrobiyal (Popiołek ve ark., 2018), analjezik, antiinflamatuvar ve antiplatelet (Todeschini ve ark., 1998), antioksidan (Başaran ve ark., 2022) dahil geniş bir spektrumda çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir. Öte yandan, bugüne kadar sentezlenen bazı hidrazon türevleri klinik uygulamalarda çeşitli hastalıkların tedavisinde ilaç olarak kullanıldıkları bilinmektedir. Bunlara; Gyromitrin, hipertansif olarak Dihidralazin ve oral nitrofuran antibiyotik olarak Nifuroksazid örnek verilebilir (Çakmak ve ark., 2022). Ayrıca, son zamanlarda bu bileşiklerin karbonik anhidraz ve kolinesteraz inhibitörleri olarak sentezlendiği ve bu enzimler üzerindeki inhibisyon aktivitelerinin incelendiği birçok çalışma yapılmıştır (Esmer ve ark., 2022; Dizdaroglu ve ark., 2020; Çavdar ve ark., 2019; Demirci ve ark., 2023; Türkoğlu ve ark., 2017).

Tıbbi kimyada önemli biyolojik ve farmakolojik aktiviteler sergileyen flor bileşikleri farmasötik araştırmalarda rutin olarak sentezlenmektedir. Günümüzde, çeşitli hastalıkların tedavi süreçlerinde kullanılan birçok ilaç flor içerir (Scheibelberger ve ark., 2023; Pietrus ve ark., 2023). Örneğin, ilk kez 1957'de sentezlenen 5-florourasil en eski sentetik florlu ilaçlardan biridir (Heidelberger ve ark., 1957). Bu ilaç, timidilat sentazı inhibe ederek yüksek antikanser aktivite gösterir. Ayrıca, fluoksetin (antidepresan), faslodeks (antikanser), fluritromisin (antibakteriyel) ve efavirenz (antiviral) flor içeren ilaçlara örnek olarak verilebilir (Şekil 2) (Purser ve ark., 2008; Khera ve ark., 2010).



Şekil 2.1. Fluoksetin ve Efavirenz'in moleküler yapıları

Öte yandan, organik sentezlerde faydalı ara maddeler olan bilinen aril sülfonat bileşikleri, ilaç kimyasında anti-kanser, antikolinesteraz ve anti-karbonik anhidraz aktiviteleri gibi önemli biyolojik özelliklere sahip bileşiklerdir (Esmer ve ark., 2022; Kamalı ve ark., 2022; Başaran ve ark., 2022; Çakmak, 2022; Başaran, 2023; Yan ve Muller, 2004; Zuse ve ark., 2007). Ayrıca, yapılan çalışmalarda, metoksi grubuna sahip bileşiklerin önemli bazı biyolojik aktiviteler gösterdikleri belirtilmiştir. Bazı çalışmalarda, metoksi grubunun bileşiklerin aktivitesine önemli katkıda bulunduğu ifade edilmiştir (Metwally, ve ark., 2013; Mathew ve ark., 2015).

3. MATERYAL VE METOTLAR

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Hedef bileşiklerin sentezi çalışmalarında kullanılan kimyasallar analitik saflığa sahip olup ek bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanılmıştır. Bu kimyasallar, bu alanda faaliyet gösteren ticari firmaların Türkiye temsilcilerinden tedarik edilmiştir. Bu çalışmada, aril sülfonat esterlerinin sentezinde başlangıç maddeleri olarak; 4-metoksibenzensülfonil klorür (M10204: Sigma-Aldrich), 2-hidroksibenzaldehit (5356:Aldrich), 3-hidroksibenzaldehit (A13541:Alfa Aesar), 4-hidroksibenzaldehit (144088:Aldrich), 2-hidroksi-4-metoksibenzaldehit (160695:Aldrich), 4-hidroksi-3-metoksibenzaldehit (143685:Sigma-Aldrich), 4-dietilamino-2-hidroksibenzaldehit (225681:Aldrich) ve 2-hidroksinaftaldehit (H45353:Aldrich) kullanılmıştır. Hedef bileşiklerin sentezinde, 4-FBH (536334:Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Sentez aşamasında, etil asetat (270989:Sigma-Aldrich), hekzan (139386: Sigma-Aldrich), diklorometan (914.014:İsolab), trietilamin (8.08352:Sigma-Aldrich), metanol (1.06007:Merck), etanol (920.026:İsolab), petrol eteri (1.01775:Merck), dietil eter (1.06050:Merck), kloroform (102445:Supelco), dimetilsülfoksit (D5879:Sigma-Aldrich) ve magnezyum sülfat (208094:Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Ayrıca, hCA I (C6653:Supelco), hCA II (C6165:Sigma-Aldrich), AChE (C3389:Sigma-Aldrich) ve BChE (C1057:Sigma-Aldrich) enzimleri ticari firmaların Türkiye temsilcisinden tedarik edilmiştir. Enzim inhibisyon çalışmalarında, sodyum hidroksit (221465:Sigma-Aldrich), Tris (T2694: Sigma-Aldrich), sodyum klorür (S9625:Sigma-Aldrich), sodyum asetat trihidrat (236500: Sigma-Aldrich), hidroklorik asit (320331: Sigma-Aldrich), asetiltiyokolin iyodür (A5751: Sigma-Aldrich), Potasyum fosfat monobazık (KH_2PO_4) (P5379: Sigma-Aldrich), butiriltiyokolin iyodür (B3253: Sigma-Aldrich), aseton (179124: Sigma-Aldrich), *p*-nitrofenil asetat (N8130: Sigma-Aldrich) ve 5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) (D8130: Sigma-Aldrich) kullanılmıştır.

3.1.2. İnce Tabaka Kromatografisi ile Reaksiyon Takibi

Sentez çalışmalarında, reaksiyon süreleri ve elde edilen maddelerin saflıklarının belirlenmesi amacıyla İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) kullanılmıştır. Adsorban olarak

25 mm kalınlığında 20x20 cm boyutlarında hazır alüminyum plaklar kullanıldı. Yeni sentezlenen moleküllerin kromatografik kontrollerinde yürütme ortamı olarak; etil asetat/hekzan (2:1) çözeltisi kullanıldı.

3.1.3. Kullanılan Cihazlar ve Yapılan Analizler

Hedef moleküllerin sentezi ve karakterizasyon çalışmaları aşağıdaki cihazlar kullanılmıştır.

Sentezlenen tüm moleküllerin erime noktaları, Barnstead IA9100 Elektrotermal Dijital Erime Noktası cihazı kullanılarak belirlendi. Element analizleri (C, H ve N), Thermo Scientific Flash 2000 element analiz cihazı kullanılarak yapıldı. NMR spektrumları, sırasıyla 400 MHz ve 100 MHz'de solvent olarak DMSO- d_6 kullanılarak Bruker Avance III 400 MHz spektrometre cihazıyla alındı. FT-IR spektrumları, ATR'li Agilent Cary 630 FTIR spektrofotometresiyle alındı.

Enzim inhibisyon çalışmalarında kullanılan alet ve cihazlar aşağıda belirtilmiştir.

Soğutmalı santrifüj	: Thermo SL16R
Spektrofotometre	: Shimatzu 2800
pH metre	: Schott pH-Meter CG840
Peristaltik pompa	: Gilgon miniplus3
Hassas terazi	: Ohaus PA214C
Otomatik pipet	: Thermo scientific
Magnetik karıştırıcı	: Stuart SB162
Saf su cihazı	: Barnstead Easy Pure UV/UF
Buzdolapları	: Arçelik
Derin dondurucu	: Arçelik Freezer (-20°C'ye kadar)

3.2. Metotlar

3.2.1. Aril Sülfonat Bileşiklerin Sentezi için Genel Prosedür

Aril sülfonatları (1a-g) sentezlemek için aşağıda açıklanan prosedür, kullanılan fenolik aldehytler ve 4-metoksibenzensülfonil klorür arasındaki tüm reaksiyonlar için aynıdır. Bu kısımda, 4-hidroksibenzaldehitin, 4-metoksibenzensülfonil klorür ile reaksiyonu ile bileşik 1c'nin sentezlenmesi örnek olarak kısaca verilmiştir (Başaran ve ark., 2022; Kamalı ve ark., 2022). 10 mL diklormetan içindeki 4-hidroksibenzaldehit (2.3 mmol) ve trietilamin (4.6 mmol) karışımı, oda sıcaklığında 30 dakika karıştırıldı. Bu solüsyona, 10 mL diklormetan içindeki 4-metoksibenzensülfonil klorür (2.3 mmol) çözeltisi damla damla eklendi. Daha sonra, oluşan reaksiyon karışımı, yaklaşık 5 saat reflüks edildi. Reaksiyonun tamamlanması İTK ile izlendi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra, reaksiyon karışımı oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve ardından iki kez 2 M HCl ile ekstrakte edildi. Organik fazlar, susuz sodyum sülfat üzerinde kurutuldu, süzüldü ve daha sonra solvent oda sıcaklığında yavaşça buharlaştırıldı. Son olarak, ham ürün birkaç kez etanol ile kristalleştirilerek saflaştırıldı.

3.2.2. Hidrazon Bileşiklerin Sentezi için Genel Prosedür

Hedef hidrazon bileşiklerinin (2a-g) sentezlenmesi için aşağıda açıklanan prosedür, aril sülfonatlar (1a-g) ve 4-FBH arasındaki tüm reaksiyonlar için aynıdır (Esmer ve ark., 2022). Burada, bileşik 1c'nin 4-FBH ile reaksiyona girerek bileşik 2c'yi sentezlenmesi örnek olarak verilmiştir. Kısaca, 10 mL etanol içindeki bileşik 1c (2 mmol) ve 4-FBH (2 mmol) karışımı 5 saat reflüks edildi. Reaksiyonun tamamlanması İTK ile izlendi. Daha sonra reaksiyon karışımı, oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Oluşan ham ürün süzüldü, petrol eteri ile iyice yıkandı ve etanol ile kristallendirildi.

3.2.3. Kolinesteraz Enzimlerinin İnhibisyon Çalışmaları

3.2.3.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Çözeltiler hazırlanırken saf su, deionize su ve steril su kullanıldı.

- 0.1 M Tris-HCl, pH = 8.0 (AChE aktivite ölçümü için)

Hazırlanışı: 12.11 g Tris 950 mL distile suda çözülerek, 1 N'lik HCl ile pH'sı 8.0'e ayarlandıktan sonra distile su hacim 1 litreye tamamlandı.

- 0.1 M KH_2PO_4 (pH=7.8) (BChE aktivite ölçümü için)

Hazırlanışı: 0.68 g KH_2PO_4 85 mL distile suda çözüldü, 1 N'lik HCl ile pH=7.8'e ayarlandı ve hacim 100 mL'ye tamamlandı.

- 2 mM asetiltiyokolin iyodür çözeltisi

Hazırlanışı: 5.96 mg asetiltiyokolin iyodür 10 mL saf suda çözülerek hazırlandı.

- 2 mM S-butiriltiyokolin iyodür çözeltisi

Hazırlanışı: 6.34 mg S-butiriltiyokolin iyodür 10 mL saf suda çözülerek hazırlandı.

- 2 mM DTNB çözeltisi

Hazırlanışı: 7.73 mg DTNB 10 mL 0.1 M KH_2PO_4 (pH=7,8) tamponunda çözülerek hazırlandı.

3.2.3.2. Kolinesteraz Enzimlerinin İnhibisyon Aktivitesinin Belirlenmesi

Bu esteraz enzimlerinin aktiviteleri Ellman yöntemi kullanılarak 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bu yöntemle göre, asetiltiyokolin substrat olarak kullanıldı.

Genel prosedür:: Asetiltiyokolin/Butiriltiyokolin, bu enzimler tarafından hidroliz edilerek tiyokoline dönüşür, daha sonra ortamda oluşan tiyokolin ise Ellman reaktifi DTNB ile tepkimeye girerek 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit bileşiğini oluşturur. Bu bileşiğin 412 nm de maksimum absorbanı vermesi sonucu AChE ve BChE enzimlerinin tepkime hızları ve aktiviteleri ölçülebilmektedir (Ellman ve ark., 1961). Reaksiyon ortamı toplam kuyu hacmi 300 μL olacak şekilde mikroluka içeriği hazırlandı. Her bir kuyuya AChE için: 120 μL tampon çözelti, 30 μL DTNB, 30 μL asetiltiyokolin, 10 μL AChE, 0-30 μL aralığında inhibitör çözeltisi ve toplam hacmi 300 μL yapacak şekilde değişen orarlarda saf su eklenerek altı dakika süre ile ölçüm yapıldı. BChE için: 120 μL tampon çözelti, 30 μL DTNB, 30 μL butiriltiyokolin, 10 μL BChE, 0-30 μL aralığında inhibitör çözeltisi ve toplam hacmi 300 μL yapacak şekilde değişen orarlarda saf su eklenerek altı dakika süre ile ölçüm yapıldı.

AChE / BChE enzimlerinin enzim ünitesi değeri hesaplanırken kullanılan formül;

$$EU / mL = \frac{\Delta OD}{t} \times \frac{V_T}{V_E} \times \frac{1}{13,6}$$

Enzim ünitesi hesaplama formülündeki semboller aşağıda verilmiştir.

EU / mL : 1 mL çözeltide bulunan enzim ünitesi değeri

ΔOD : Zamana göre absorbans farkı değişimi

T : Zaman (dk)

13.6 : DTNB için ekstinksiyon katsayısı

V_T : Toplam hacim (mL)

V_E : Küvete katılan enzim miktarı (mL)

İnhibitörler için IC_{50} değerlerinin belirlenmesine ait çalışmalar aşağıda verilmiştir.

Sentezlenen yeni moleküller için farklı inhibitör konsantrasyonlarında aktiviteleri ölçülerek % aktivite - [I] olarak grafikleri çizildi, eğrinin denkleminde IC_{50} değerleri hesaplandı.

3.2.4. İnsan Karbonik Anhidraz Enzimlerinin İnhibisyon Çalışmaları

3.2.4.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

➤ 3 mM *p*-nitrofenil asetat (PNFA) substrat çözeltisi

Hazırlanışı: 14 mg PNFA 1 mL asetonda çözöldü. Daha sonra, bu çözeltiye 24 mL ultra saf su ilave edildi. ve manyetik bar brakılan 50 mL bir behere aseton içerisinde çözölen PNFA azar azar ve yavaşça ilave edilir.

3.2.4.2. Karbonik Anhidraz Enzimlerinin İnhibisyon Aktivitesinin Belirlenmesi

hCA I ve hCA II enzimleri üzerinde yeni moleküllerin inhibisyon aktivitesi Verpoorte metoduna göre ölçöldü (Verpoorte ve ark., 1967). Bu metod, karbonik anhidrazın esteraz aktivitesine sahip olması esasına dayanmaktadır. Karbonik anhidraz, substrat olarak kullanılan *p*-nitrofenilasetatı 348 nm’de absorbans veren *p*-nitrofenolat veya *p*-nitrofenol’e hidrolize eder ($\epsilon_{348} = 5 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Esteraz aktivitesi prosedürü, Lineweaver Burk prosedürü ile inhibitör ajanların belirlenmesi için kullanıldı (Lineweaver ve Burk, 1934). Karbonik anhidraz enzimlerinin aktivitesi (%)’ye karşı

inhibitör konsantrasyon ve $1/V$ 'ye karşı $1/[S]$ grafikler çizildi (Shirinzadeh ve Dilek, 2020).

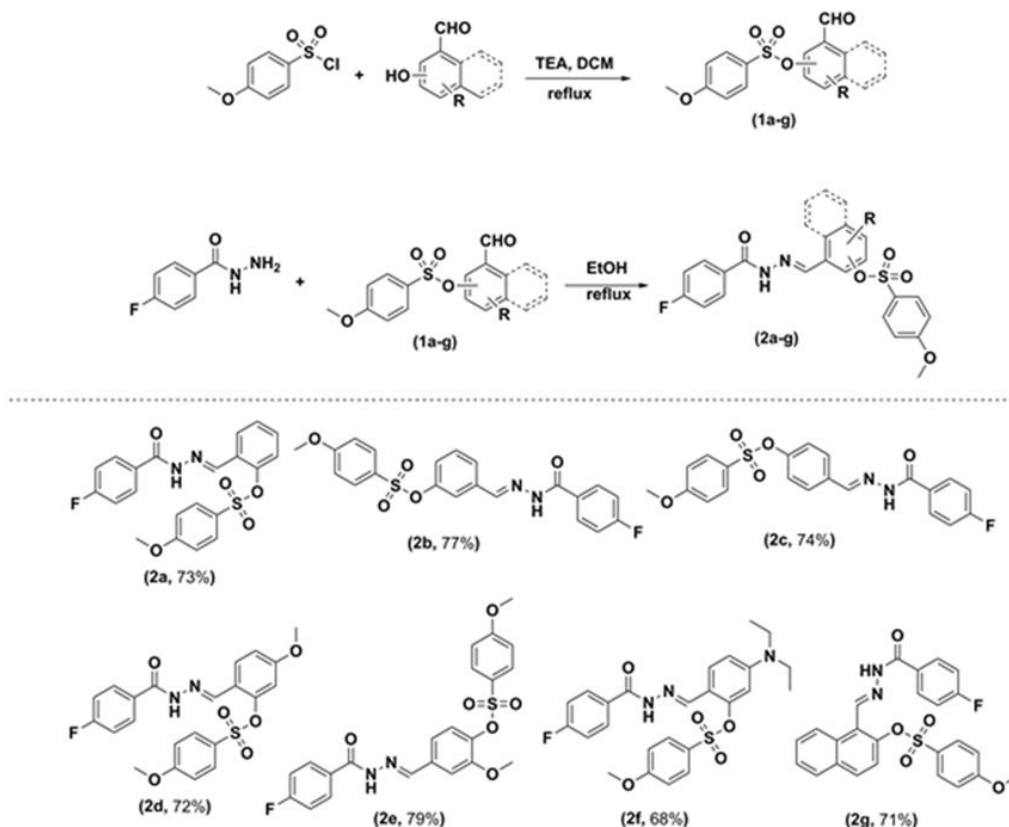
Hedef bileşiklerin sentezi Batman Üniversitesi, Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojileri bölümüne ait laboratuvarında Doç. Dr. Reşit ÇAKMAK gözetiminde yapılırken, biyolojik aktivite çalışmaları Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı'na ait laboratuvarında Prof. Dr. Murat ŞENTÜRK gözetiminde yapıldı.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Sentez ve Karakterizasyon

Yeni metabolik enzim inhibitörleri keşfetme çalışmalarımızın bir parçası olarak, burada ilk kez iki basamakta iyi verimle bazı yeni hidrazon bileşiklerini sentezledik (Başan ve ark., 2022, Esmer ve ark., 2022; Kamalı ve ark., 2022). Yapısında aril sülfonil grubu taşıyan bu hedef bileşiklerin sentezi, Şekil 4.1’de gösterildi. Yeni inhibitörlerin sentezine yönelik yaklaşımımız, yapısında biyolojik olarak aktif atom veya grupların yer aldığı yeni hibrit moleküller sentezlenmesidir. Hedef moleküllerin sentezlenmesi için ilk basamakta yedi aril sülfonat esteri (1a-g) sentezlendi. Bu bileşikler, yedi fenolik aldehidin 4-metoksibenzensülfonil klorür reaksiyonu ile hazırlandı. Daha sonra, hazırlanan bu sülfonat bileşiklerinin 4-FBH reaksiyonu ile yeni hidrazon bileşikleri (**2a-g**) elde edildi. Yeni sentezlenen hibrit moleküller katı halde elde edildi ve yapılarının aydınlatılmasında elemental analizi, FT-IR, ¹H NMR ve ¹³C NMR spektroskopisi kullanılmıştır. Karakterizasyon verileri incelendiğinde karakterizasyon verilerinin molekül yapılarıyla uyumlu olduğu belirlendi.

Öte yandan, hedef moleküllerin hazırlanmasında kullanılan aril sülfonatlar (1a-g) daha önceki bir çalışmamızda sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir (Başaran ve ark., 2022).



Şekil 4.1. Yeni hidrazon bileşiklerinin sentezi

Bu çalışma kapsamında ilk defa sentezlenen tüm bileşiklerin ^1H NMR spektrumları 400 MHz ayırma gücüne sahip cihazla ve çözücü olarak $\text{DMSO}-d_6$ kullanılarak alınmıştır. Hedef bileşiklerin (2a-g) ^1H NMR spektrumlarında azometin protonu ($-\text{CH}=\text{N}-$) en belirgin özelliği sergileyerek hidrazon yapısının varlığına işaret etmektedir. Azometin protonları, 8.35 ila 8.73 ppm aralığında belirgin bir tekli sinyal sergiledi. Aromatik protonlar 6.00 ila 9.24 ppm aralığında rezonans sergiledi. İlgili hidrazon bileşiği **2f**'nin metil ve metilen protonları sırasıyla 1.00 ppm ve 3.25 ppm'de rezonansa girdi. Metoksi gruplarının yapılarına dahil edilmesiyle karakterize edilen (2a-g) bileşiklerin alifatik protonları, 3.56-3.88 ppm'de tekli olarak rezonansa girdi.

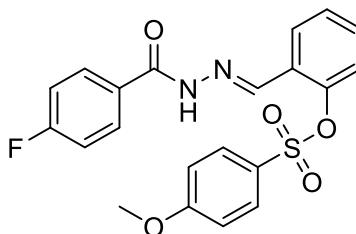
Yeni sentezlenen bileşiklerin ^{13}C NMR spektrumları 100 MHz ayırma gücüne sahip NMR cihazıyla ve çözücü olarak $\text{DMSO}-d_6$ kullanılarak kaydedilmiştir. Yeni sentezlenen moleküllerin (2a-g) ^{13}C NMR spektrumları, $\text{C}=\text{O}$ 'nun karbon sinyali için 162.04 ila 162.65 ppm aralığında belirgin bir zirve ortaya çıkardı. Azometin karbon zirvesinin tanımlanması, arzu edilen bileşiklerin yapılarının belirlenmesinde en belirgin özelliktir. $\text{CH}=\text{N}$ 'nin karbon rezonans zirvesi 147.69–153.19 ppm arasında tespit edildi. Aromatik karbonlar için gözlemlenen rezonans sinyalleri 104.19–166.00 ppm aralığında olduğu belirlendi. Bileşik 2f'deki metil ve metilen karbonlar sırasıyla 12.64 ve 44.33

ppm'de gözlemlendi. Yapısında metoksi grubu taşıyan bu bileşiklerdeki karbon sinyali 56.14–56.41 ppm'de tespit edildi.

Yeni sentezlenen tüm bileşiklerin (2a-g), 400-4000 cm^{-1} aralığında sahip FT-IR/ATR cihazı yardımıyla FT-IR spektrumları alınarak yapılarındaki fonksiyonel grupların gerilme titreşim bantları tespit edildi. Bileşiklerin FT-IR spektrumları, yapılarındaki NH gerilme bandının konumunun, molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağı etkileşimlerinin yoğunluğuna bağlı olarak değişen davranışlar sergileyebileceğini göstermiştir. Bu açıdan bakıldığında NH gerilme bantlarının 3195–3358 cm^{-1} aralığında olduğu görülmüştür. Bu bileşiklerin en belirgin özelliği C=O bağının gerilme bandıydı. Yukarıda adı geçen bu bileşikler, C=O gerilme bantlarına karşılık gelen 1640-1683 cm^{-1} aralığında oldukça tanımlanmış tepe noktaları sergiledi. Yapı içerisindeki C=N gerilme bantlarının titreşimleri 1594–1607 cm^{-1} spektral aralığında gözlenmiştir. Ayrıca, SO₂ gruplarının hem asimetrik hem de simetrik gerilme bantlarının sırasıyla 1340–1374 ve 1147–1169 cm^{-1} 'de yer aldığı gözlemlendi.

4.2. Yeni Sentezlenen Moleküller ve Analiz Sonuçları

4.2.1. 2-((2-(4-Florobenzoil)hidrazono)metil)fenil 4-metoksibenzensülfonat (2a)



Şekil 3.2. Bileşik 2a'nın kimyasal yapısı

4-FBH (2 mmol) ve 2-formilfenil 4-metoksibenzensülfonat (**1a**) (2 mmol) reaksiyonu, beyaz bir katı halinde %73 verimle bileşik **2a**'yı verdi (E.n.:184-185°C) (Şekil 4.2).

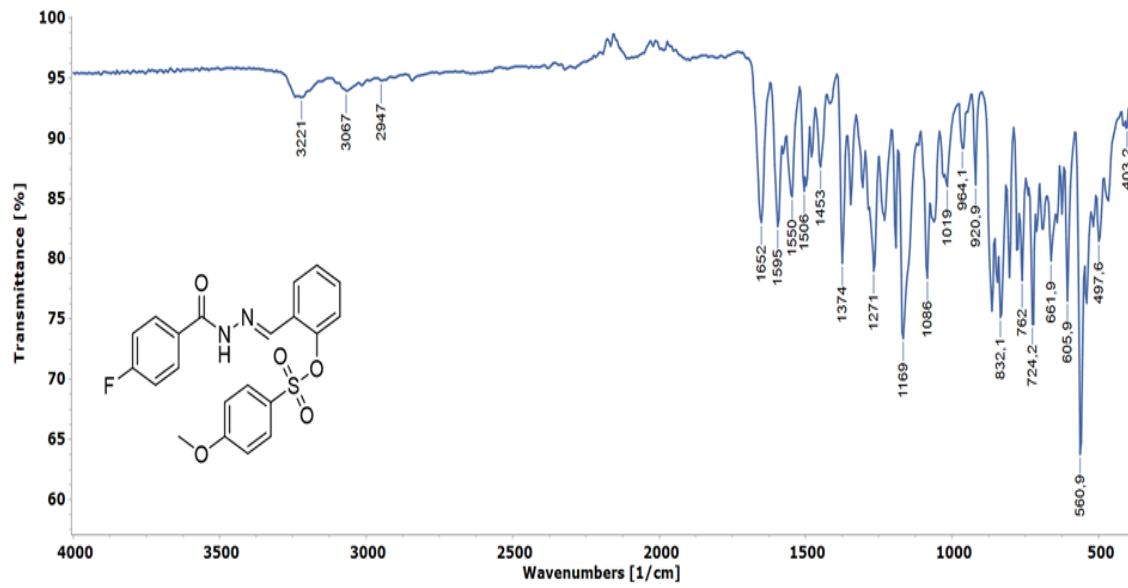
FT-IR (cm^{-1} , ν_{max}): 3221 (N-H), 3067 (C-H), 1652 (C=O), 1595 (C=N), 1374 and 1169 (SO₂). (Şekil 4.3).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz, ppm): δ 11.91 (s, 1H, -CONH), 8.44 (s, 1H, -CH=N), 8.04 – 7.98 (m, 2H, aromatik protonlar), 7.90 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, aromatik proton), 7.76 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, aromatik protonlar), 7.50 – 7.46 (m, 1H, aromatik proton), 7.42 (d, *J*

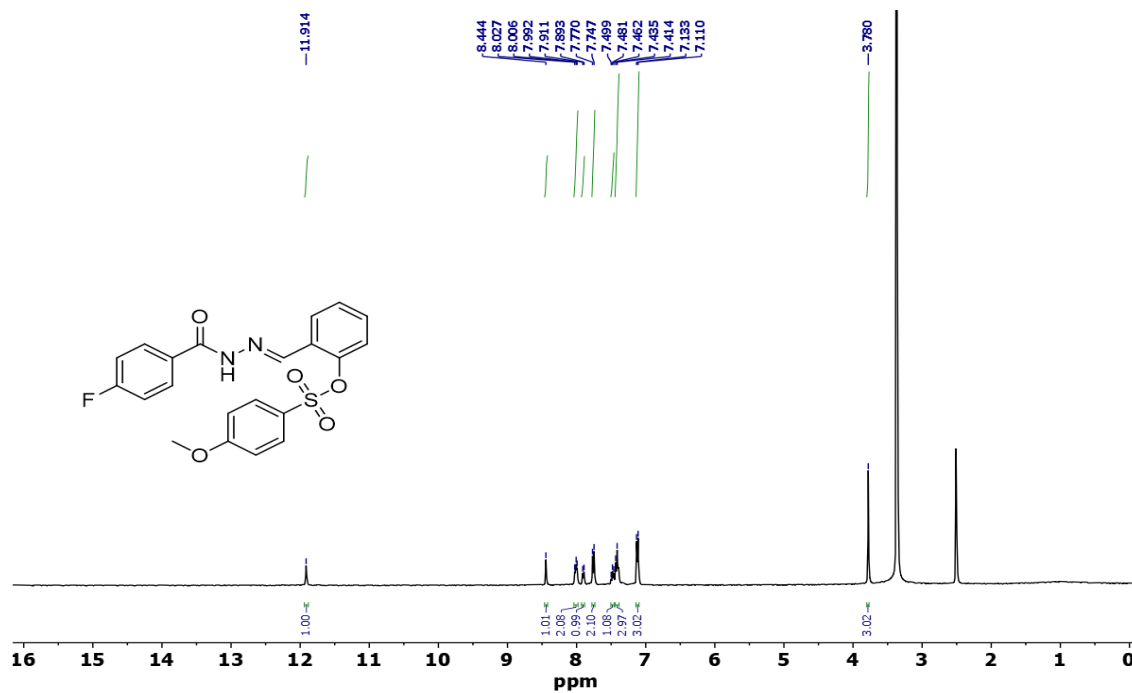
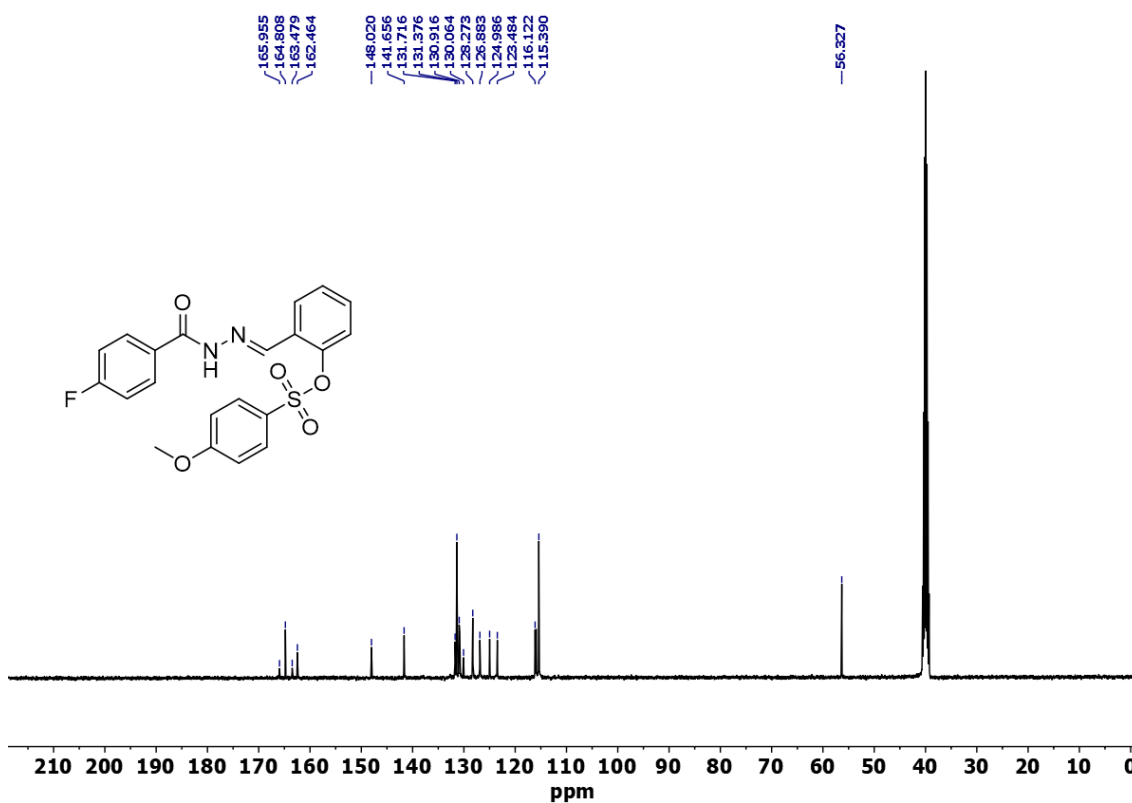
= 8.4 Hz, 3H, aromatik protonlar), 7.12 (d, $J = 9.0$ Hz, 3H, aromatik protonlar), 3.78 (s, 3H, OCH₃). (Şekil 4.4).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz, ppm): 162.46 (C=O), 148.02 (C=N), 165.96, 164.81, 163.48, 141.66, 131.72, 131.38, 130.92, 130.06, 128.27, 126.88, 124.99, 123.48, 116.12, 115.39 (aromatik karbonlar), 56.33 (OCH₃). (Şekil 4.5).

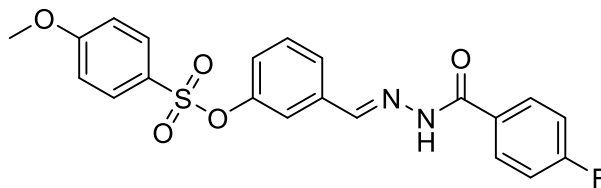
Elemental analiz sonucu; C₂₁H₁₇FN₂O₅S için Hesaplanan (%): C, 58.87; H, 4.00; N, 6.54; S, 7.48. **Bulunan (%):** C, 58.91; H, 4.03; N, 6.48; S, 7.35.



Şekil 4.3. Bileşik 2a'nın FT-IR spektrumu

Şekil 4.4. Bileşik 2a'nın ¹H NMR spektrumuŞekil 4.5. Bileşik 2a'nın ¹³C NMR spektrumu

4.2.2. 3-((2-(4-Florobenzoil)hidrazono)metil)fenil 4-metoksibenzensülfonat (2b)



Şekil 4.6. Bileşik 2b'nin kimyasal yapısı

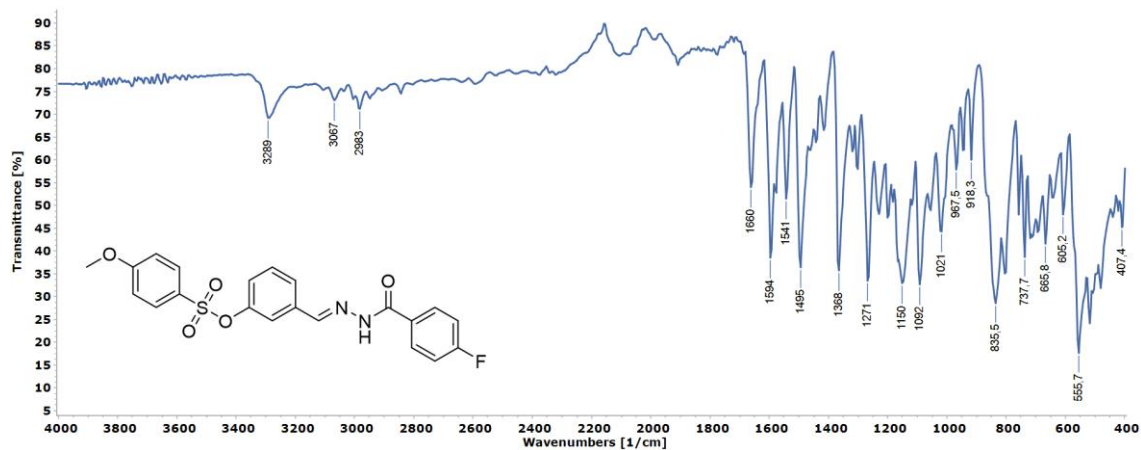
4-FBH (2 mmol) ve 3-formilfenil 4-metoksibenzensülfonatın (**lb**) (2 mmol) reaksiyonu, beyaz bir katı halinde %77 verimle bileşik **2b**'yi verdi (**E.n.**: 193-194°C) (Şekil 4.6).

FT-IR (cm⁻¹, $\nu_{\max}$): 3289 (N-H), 3067 (C-H), 1660 (C=O), 1594 (C=N), 1368 and 1150 (SO₂). (Şekil 4.7).

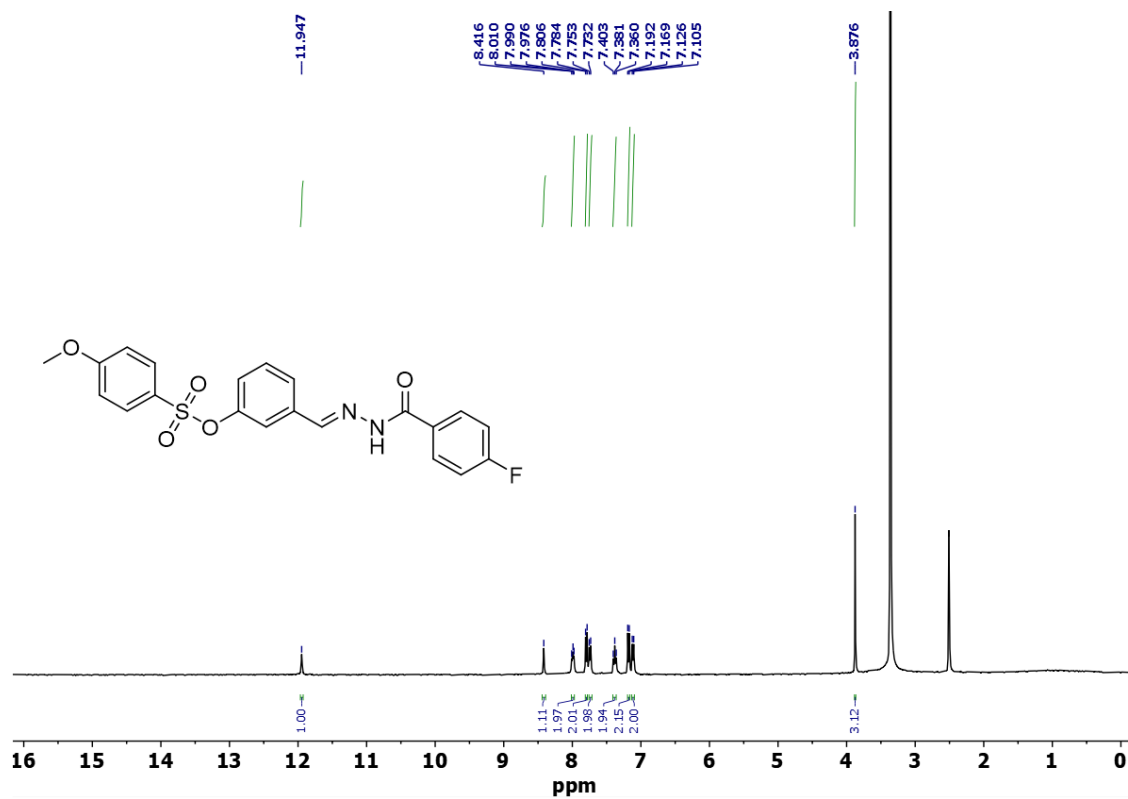
¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz, ppm): δ 11.95 (s, 1H, -CONH), 8.42 (s, 1H, -CH=N), 8.01 – 7.97 (m, 2H, aromatik protonlar), 7.90 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, aromatik protonlar), 7.74 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, aromatik protonlar), 7.39 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, aromatik protonlar), 7.18 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, aromatik protonlar), 7.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, aromatik protonlar), 3.88 (s, 3H, OCH₃). (Şekil 4.8).

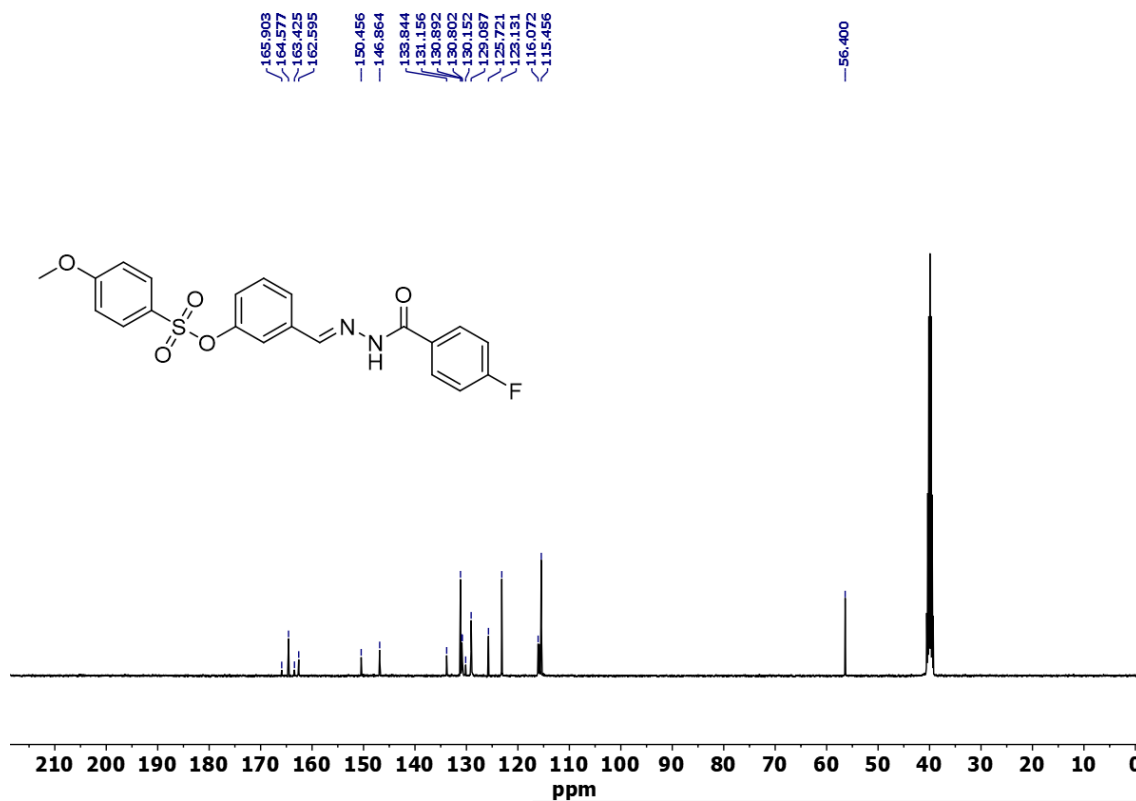
¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz, ppm): 162.59 (C=O), 150.46 (C=N), 165.90, 164.58, 163.42, 146.86, 133.84, 131.16, 130.89, 130.80, 130.15, 129.09, 125.72, 123.13, 116.07, 115.46 (aromatik carbonlar), 56.40 (OCH₃). (Şekil 4.9).

Elemental analiz sonucu; C₂₁H₁₇FN₂O₅S için Hesaplanan(%): C, 58.87; H, 4.00; N, 6.54; S, 7.48. **Bulunan (%):** C, 58.82; H, 4.01; N, 6.59; S, 7.42.



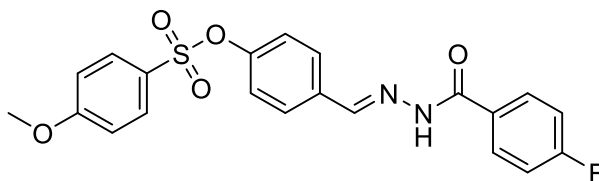
Şekil 4.7. Bileşik 2b'nin FT-IR spektrumu

Şekil 4.8. Bileşik 2b'nin ¹H NMR spektrumu



Şekil 4.9. Bileşik 2b'nin ¹³C NMR spektrumu

4.2.3. 4-((2-(4-Florobenzoil)hidrazono)metil)fenil 4-metoksibenzensülfonat (2c)



Şekil 4. Bileşik 2c'nin kimyasal yapısı

4-FBH (2 mmol) ve 4-formilfenil 4-metoksibenzensülfonatın (**1c**) (2 mmol) reaksiyonu, beyazımsı bir katı halinde %74 verimle bileşik **2c**'yi verdi (E.n.:156-157°C) (Şekil 4.10).

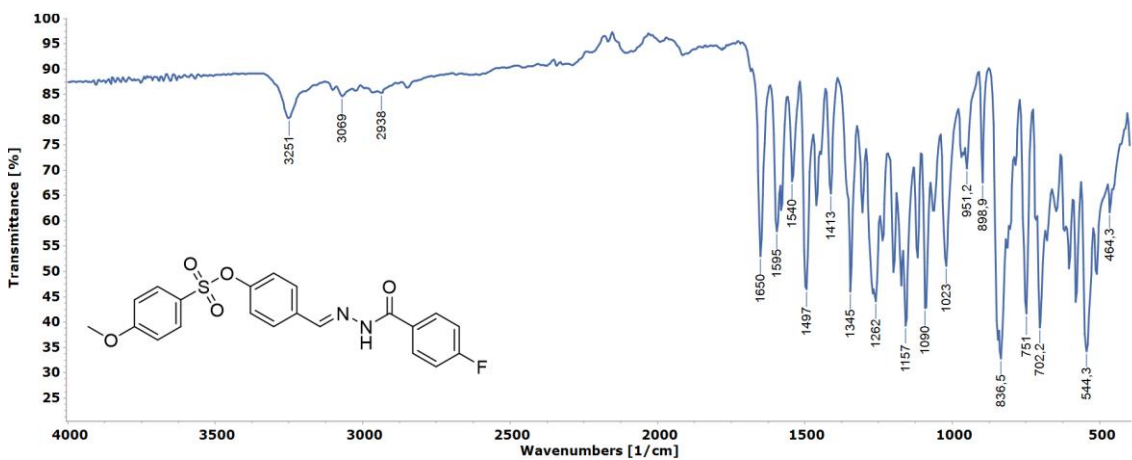
FT-IR (cm⁻¹, ν_{max}): 3251 (N-H), 3069 (C-H), 1650 (C=O), 1595 (C=N), 1345 and 1147 (SO₂). (Şekil 4.11).

¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, ppm): δ 11.97 (s, 1H, -CONH), 8.39 (s, 1H, -CH=N), 8.02 – 7.98 (m, 2H, aromatik protonlar), 7.82 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, aromatik protonlar), 7.67 (d, *J* = 6.66 Hz, 2H, aromatik protonlar), 7.49 – 7.46 (m, 2H, aromatik protonlar),

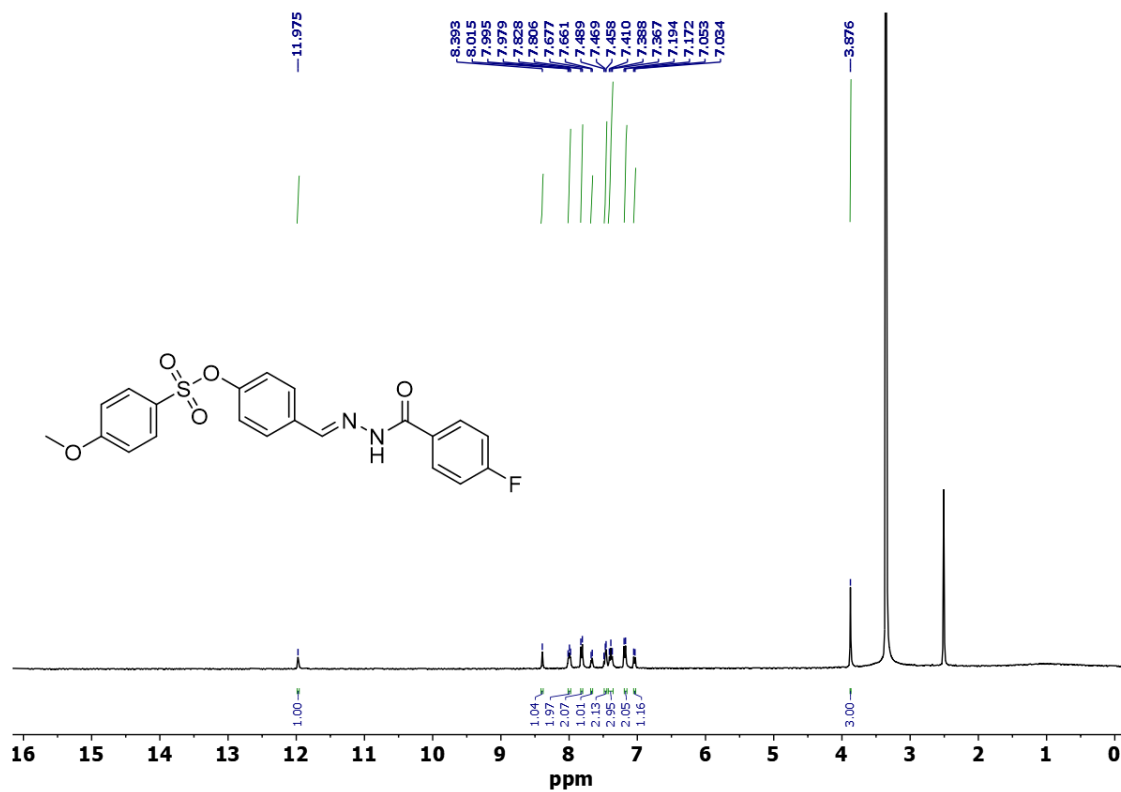
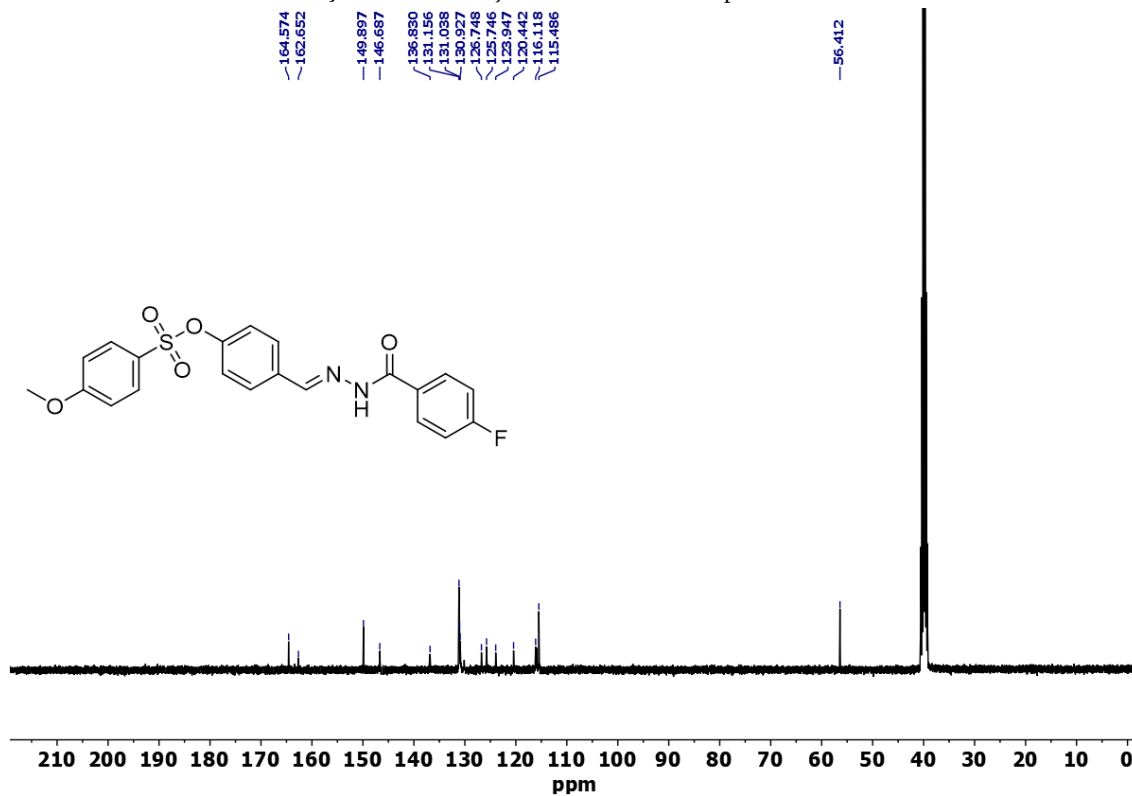
7.39 (t, $J = 8.5$ Hz, 3H, aromatik protonlar), 7.17 (s, 2H, aromatik protonlar), 7.04 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, aromatik proton), 3.88 (s, 3H, OCH_3). (Şekil 4.12).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz, ppm): 162.65 (C=O), 149.90 (C=N), 164.57, 146.69, 136.83, 131.16, 131.04, 130.93, 126.75, 125.75, 123.95, 120.44, 116.12, 115.49 (aromatik karbonlar), 56.41 (OCH_3). (Şekil 4.13).

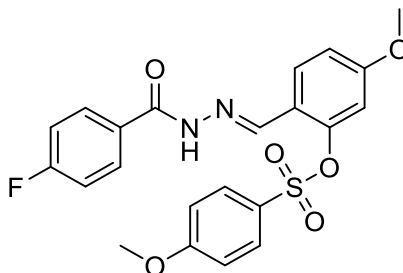
Elemental analiz sonucu; $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{FN}_2\text{O}_5\text{S}$ için Hesaplanan: C, 58.87; H, 4.00; N, 6.54; S, 7.48. Bulunan (%): C, 58.82; H, 4.01; N, 6.59; S, 7.42.



Şekil 4.11. Bileşik 2c'nin FT-IR spektrumu

Şekil 5.12. Bileşik 2c'nin ¹H NMR spektrumuŞekil 4.13. Bileşik 2c'nin ¹³C NMR spektrumu

4.2.4. 2-((2-(4-Florobenzoil)hidrazono)metil)-5-metoksifenil 4-metoksibenzensülfonat (2d)



Şekil 6. Bileşik 2d'nin kimyasal yapısı

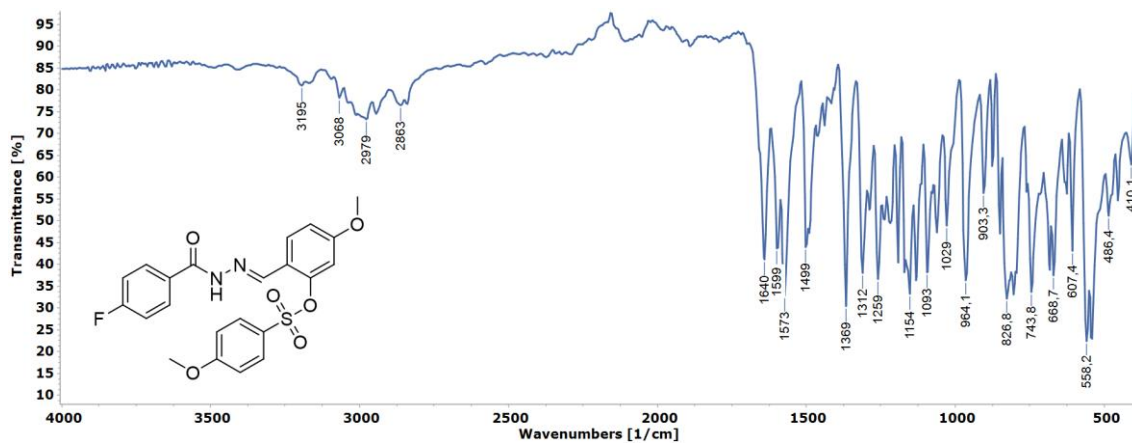
4-FBH (2 mmol) ve 2-formil-5-metoksifenil 4-metoksibenzensülfonatın (**1d**) (2 mmol) reaksiyonu, beyaz bir katı halinde %72 verimle bileşik **2d**'yi verdi (**E.n.**: 160-161°C) (Şekil 4.14).

FT-IR (cm⁻¹, $\nu_{\max}$): 3195 (N-H), 3068 (C-H), 1640 (C=O), 1599 (C=N), 1369 and 1154 (SO₂). (Şekil 4.15).

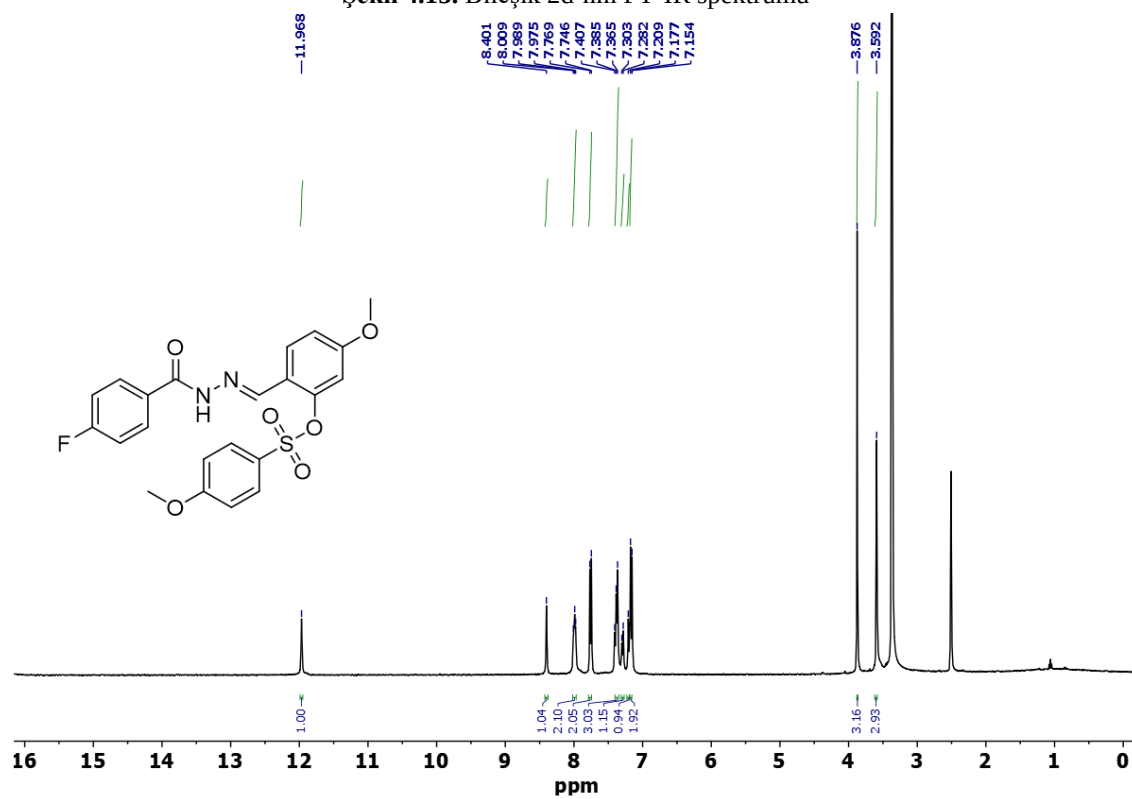
¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz, ppm): δ 11.97 (s, 1H, -CONH), 8.40 (s, 1H, -CH=N), 8.02 – 7.97 (m, 2H, aromatik protonlar), 7.76 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, aromatik protonlar), 7.38 (d, *J* = 8.2 Hz, 3H, aromatik protonlar), 7.29 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, aromatik proton), 7.21 (s, 1H, aromatik proton), 7.17 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, aromatik protonlar), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 3.59 (s, 3H, OCH₃). (Şekil 4.16).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz, ppm): 162.65 (C=O), 152.09 (C=N), 164.49, 147.20, 139.19, 134.89, 131.16, 130.90, 130.81, 126.49, 124.43, 120.82, 116.10, 115.89, 115.05, 110.76 (aromatik karbonlar), 56.41 (OCH₃), 56.14 (OCH₃). (Şekil 4.17).

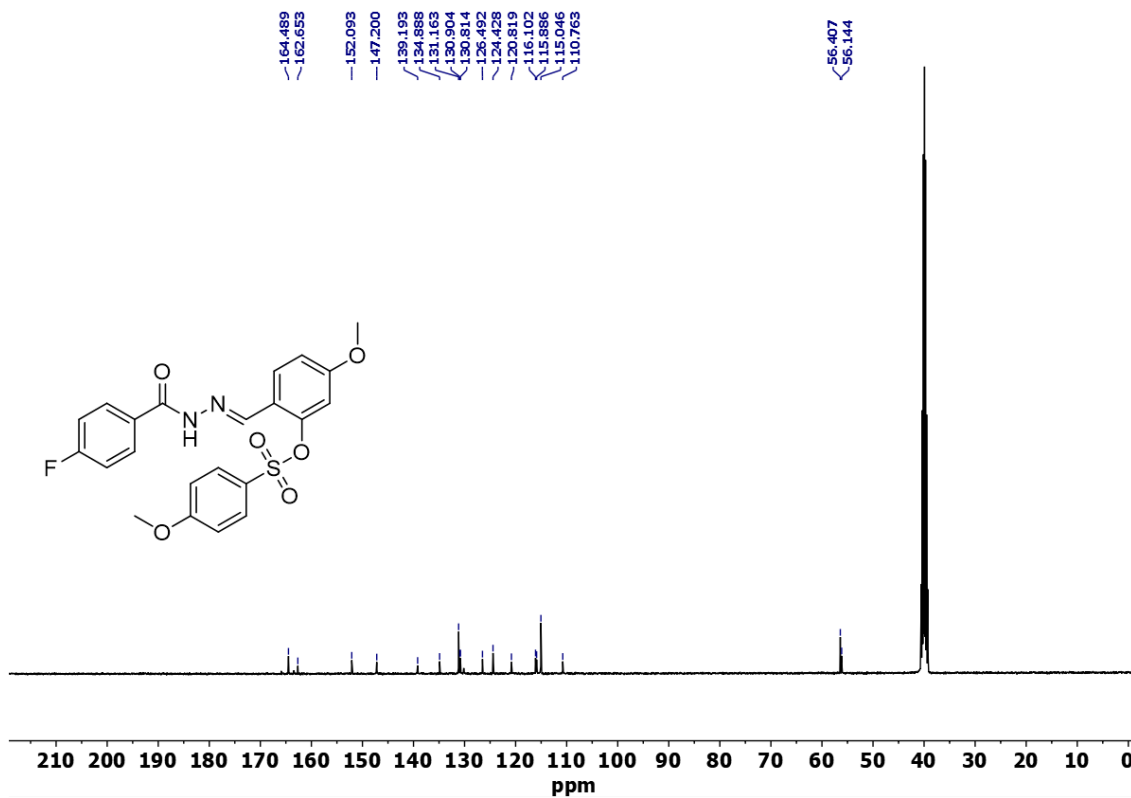
Emental analiz sonucu; C₂₂H₁₉FN₂O₆S için Hesaplanan (%): C, 57.64; H, 4.18; N, 6.11; S, 6.99. **Bulunan (%):** C, 57.71; H, 4.22; N, 6.04; S, 6.87.



Şekil 4.15. Bileşik 2d'nin FT-IR spektrumu

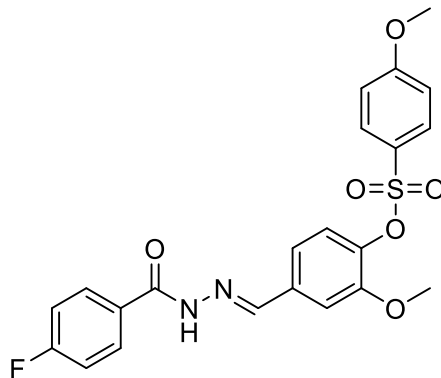


Şekil 7. Bileşik 2d'nin ¹H NMR spektrumu



Şekil 4.17. Bileşik 2d'nin ¹³C NMR spektrumu

4.2.5. 4-((2-(4-Florobenzoil)hidrazono)metil)-2-metoksifenil 4-metoksibenzensülfonat (2e)



Şekil 4.18. Bileşik 2e'nin kimyasal yapısı

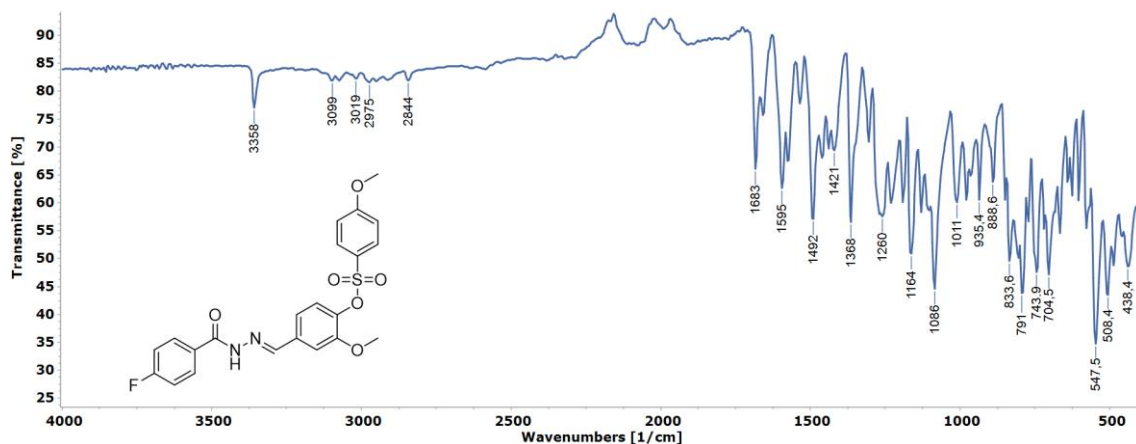
4-FBH (2 mmol) ve 4-formil-2-metoksifenil 4-metoksibenzensülfonat (**1e**) (2 mmol) reaksiyonu, beyaz bir katı halinde %79 verimle bileşik **2e**'yi verdi (**E.n.**: 197-198°C) (Şekil 4.18).

FT-IR (cm⁻¹, $\nu_{\max}$): 3358 (N-H), 3099 (C-H), 1683 (C=O), 1595 (C=N), 1368 and 1164 (SO₂). (Şekil 4.19).

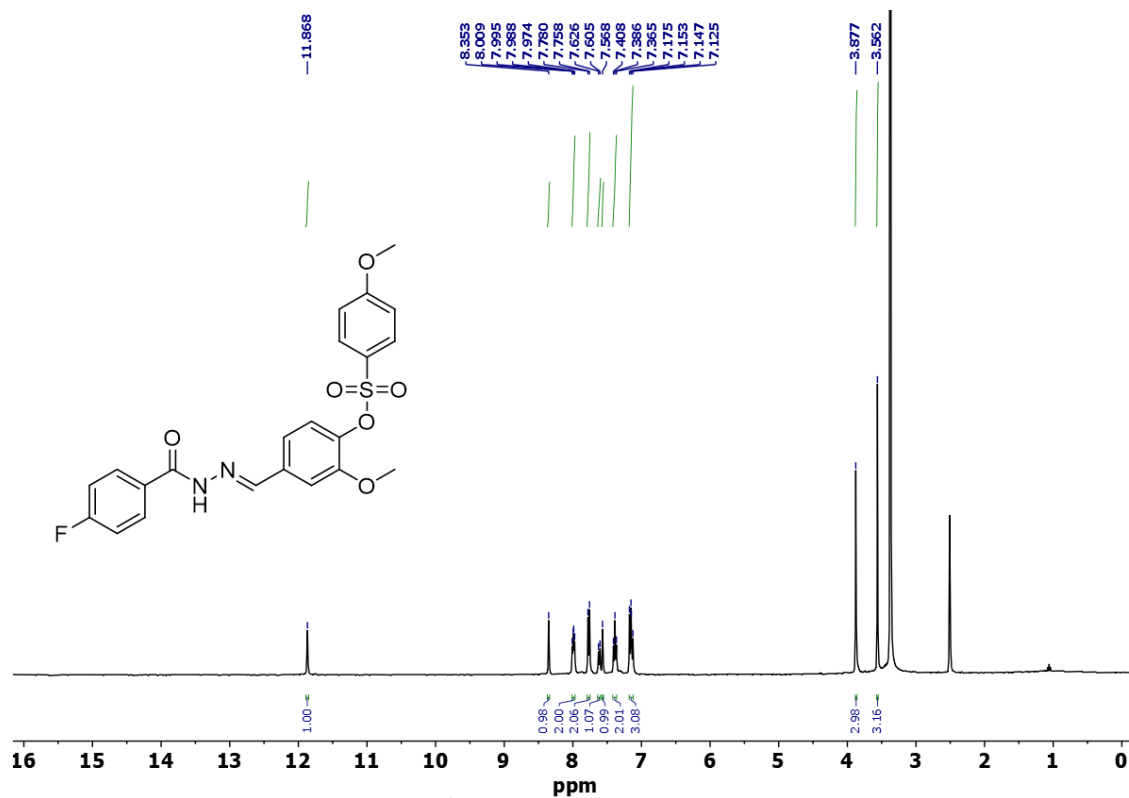
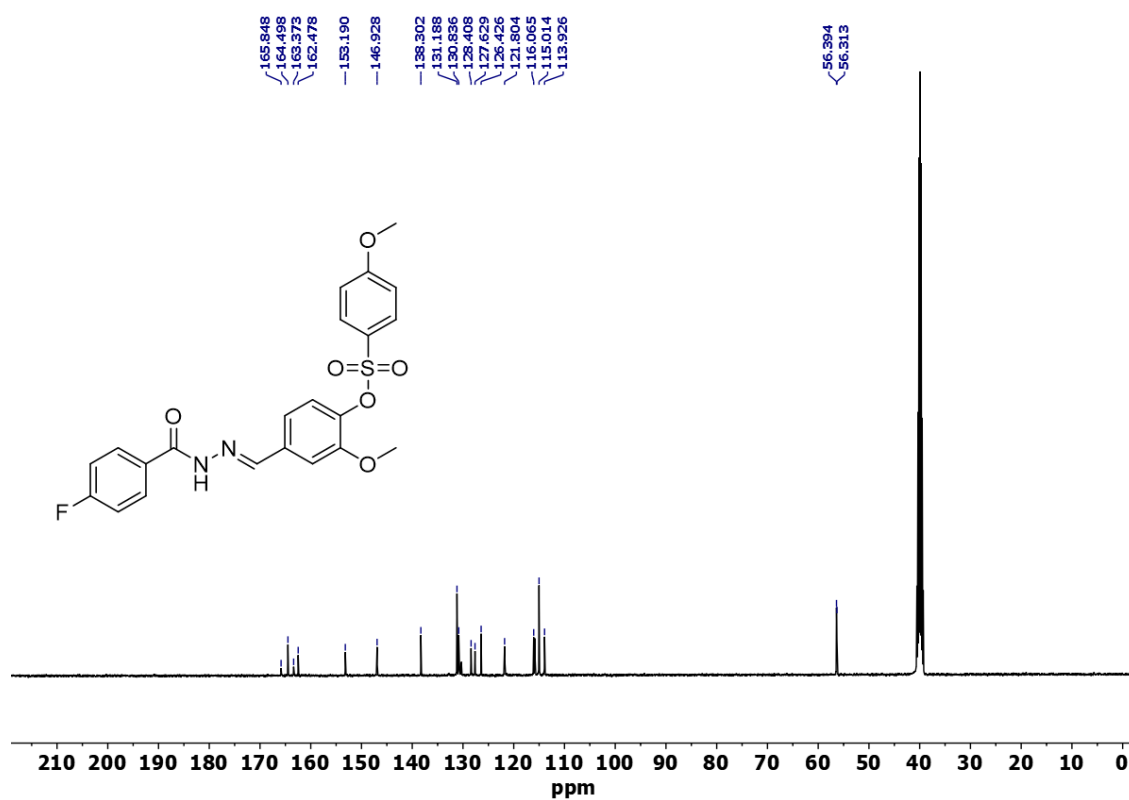
¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz, ppm): δ 11.87 (s, 1H, -CONH), 8.35 (s, 1H, -CH=N), 7.99 (dd, *J* = 8.4, 5.6 Hz, 2H, aromatik protonlar), 7.77 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, aromatik protonlar), 7.62 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, aromatik proton), 7.57 (s, 1H, aromatik proton), 7.39 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H, aromatik protonlar), 7.18 – 7.13 (m, 3H, aromatik protonlar) 3.88 (s, 3H, OCH₃), 3.56 (s, 3H, OCH₃). (Şekil 4.20).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz, ppm): 162.48 (C=O), 153.19 (C=N), 165.85, 164.50, 163.37, 146.93, 138.30, 131.19, 130.84, 128.41, 127.63, 126.43, 121.80, 116.06, 115.01, 113.93 (aromatik karbonlar), 56.39 (OCH₃), 56.31 (OCH₃). (Şekil 4.21).

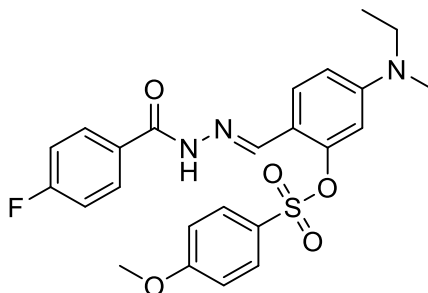
Elemental analiz sonucu; C₂₂H₁₉FN₂O₆S için Hesaplanan(%): C, 57.64; H, 4.18; N, 6.11; S, 6.99. **Bulunan (%):** C, 57.60; H, 4.17; N, 6.17; S, 7.03.



Şekil 8. Bileşik 2c'nin FT-IR spektrumu

Şekil 9. Bileşik 2e'nin ¹H NMR spektrumuŞekil 4.21. Bileşik 2e'nin ¹³C NMR spektrumu

4.2.6. 5-(Dietilamino)-2-((2-(4-florobenzoil)hidrazono)metil)fenil 4-metoksibenzensülfonat (2f)



Şekil 10. Bileşik 2f'nin kimyasal yapısı

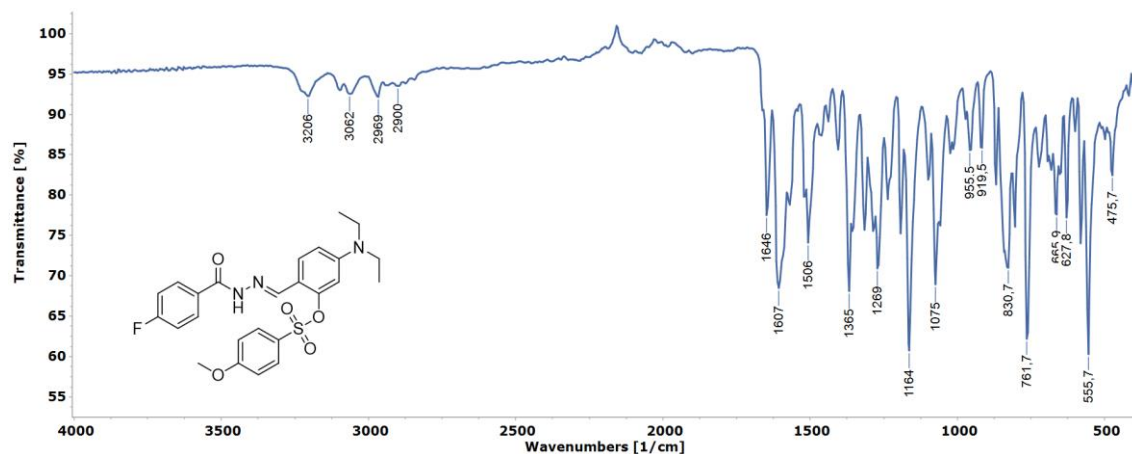
4-FBH (2 mmol) ve 5-(dietilamino)-2-formilfenil 4-metoksibenzensülfonat (**1f**) (2 mmol) reaksiyonu, açık sarı bir katı halinde %68 verimle bileşik **2f**'yi verdi (**E.n.**: 224-226°C) (Şekil 4.22).

FT-IR (cm⁻¹, $\nu_{\max}$): 3206 (N-H), 3062 (C-H), 1646 (C=O), 1607 (C=N), 1365 and 1164 (SO₂). (Şekil 4.23).

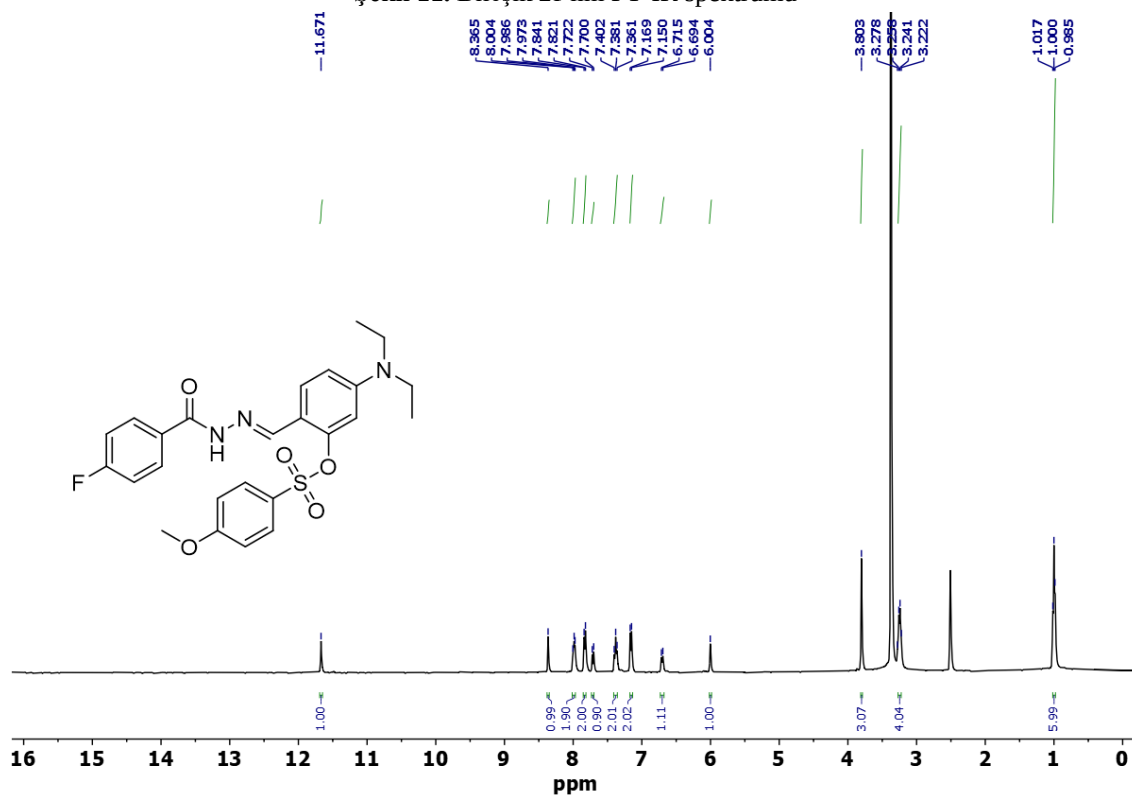
¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz, ppm): δ 11.67 (s, 1H, -CONH), 8.36 (s, 1H, -CH=N), 8.01 – 7.97 (m, 2H, aromatik protonlar), 7.83 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, aromatik protonlar), 7.71 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, aromatik protonlar), 7.38 (t, *J* = 8.2 Hz, 2H, aromatik protonlar), 7.16 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, aromatik protonlar), 6.70 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, aromatik proton), 6.00 (s, 1H, aromatik proton), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 3.25 (q, 4H, CH₂x2), 1.00 (t, *J* = 6.3 Hz, 6H, CH₃x2). (Şekil 4.24).

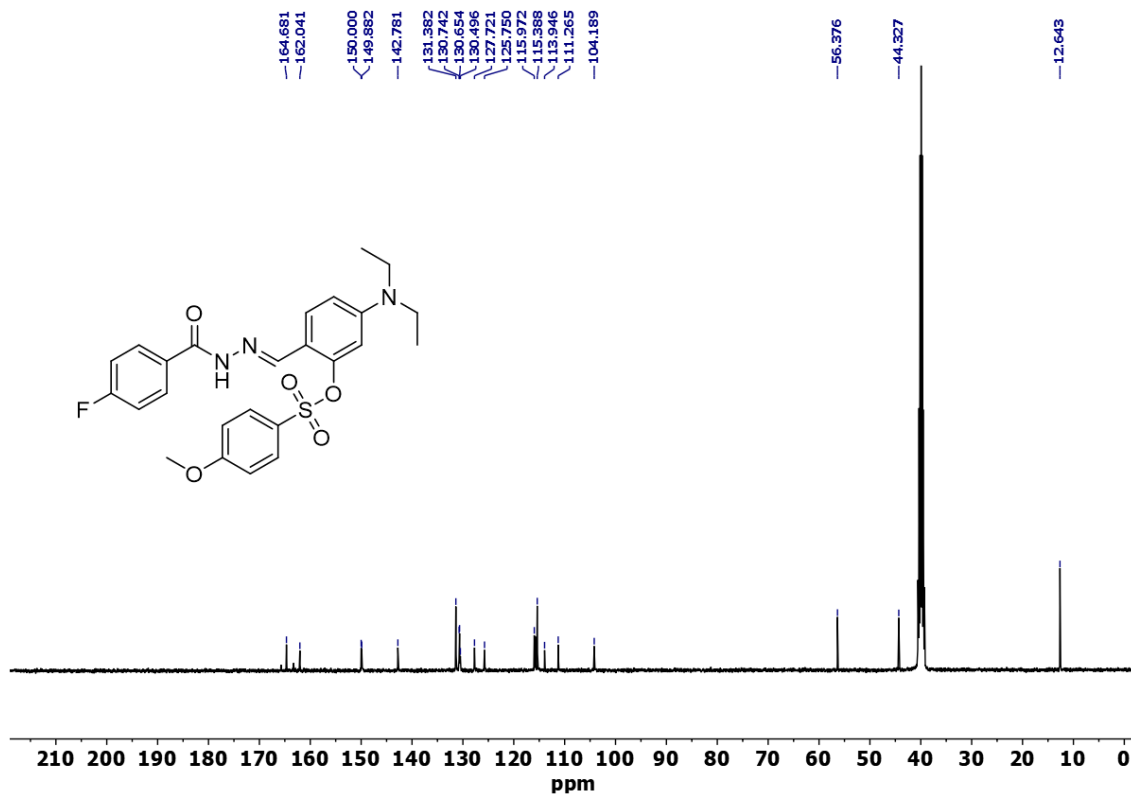
¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz, ppm): 162.04 (C=O), 150.00 (C=N), 164.68, 149.88, 142.78, 131.38, 130.74, 130.65, 130.50, 127.72, 125.75, 115.97, 115.39, 113.95, 111.26, 104.19 (aromatik karbonlar), 56.38 (OCH₃), 44.33 (CH₂x2), 12.64 (CH₃x2). (Şekil 4.25).

Elemental analiz sonucu; C₂₅H₂₆FN₃O₅S için Hesaplanan(%): C, 60.61; H, 5.25; N, 8.41; S, 6.42. **Bulunan (%):** C, 60.57; H, 5.27; N, 8.49; S, 6.49.



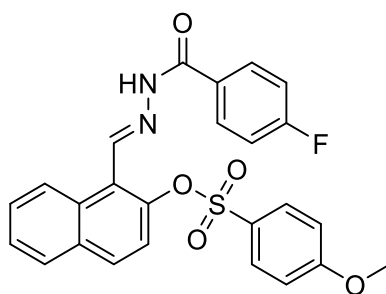
Şekil 11. Bileşik 2f'nin FT-IR spektrumu

Şekil 4.24. Bileşik 2f'nin ¹H NMR spektrumu



Şekil 12. Bileşik 2f'nin ^{13}C NMR spektrumu

4.2.7. 1-((2-(4-Florobenzoil)hidrazono)metil)naftalen-2-il 4-metoksibenzensülfonat (2g)



Şekil 13. Bileşik 2g'nin kimyasal yapısı

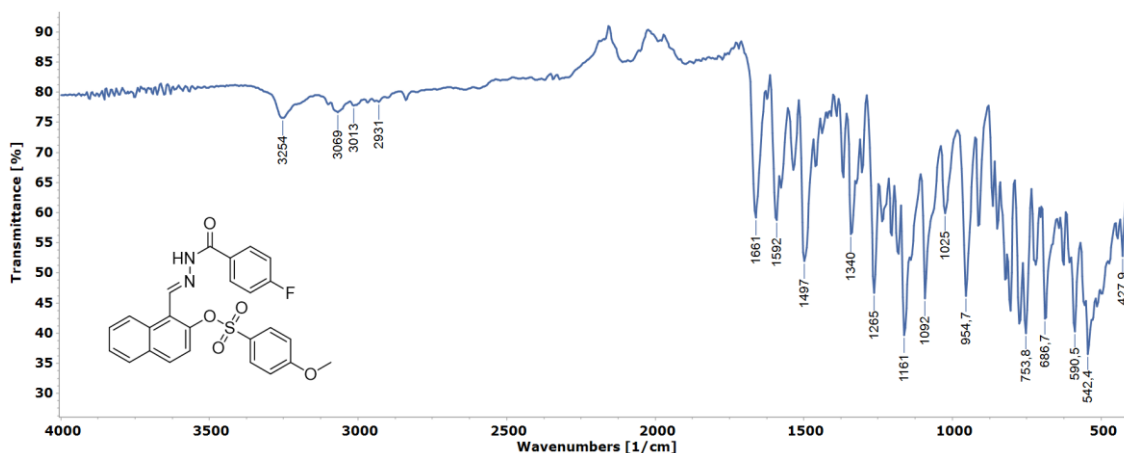
4-FBH (2 mmol) ve 1-formilnaftalen-2-il 4-metoksibenzensülfonatın (**1g**) (2 mmol) reaksiyonu, sarı bir katı halinde %71 verimle **2g** bileşiğini verdi (**E.n.**: 183-185°C) (Şekil 4.26).

FT-IR (cm^{-1} , ν_{max}): 3254 (N-H), 3069 (C-H), 1661 (C=O), 1592 (C=N), 1340 and 1161 (SO_2) (Şekil 4.27).

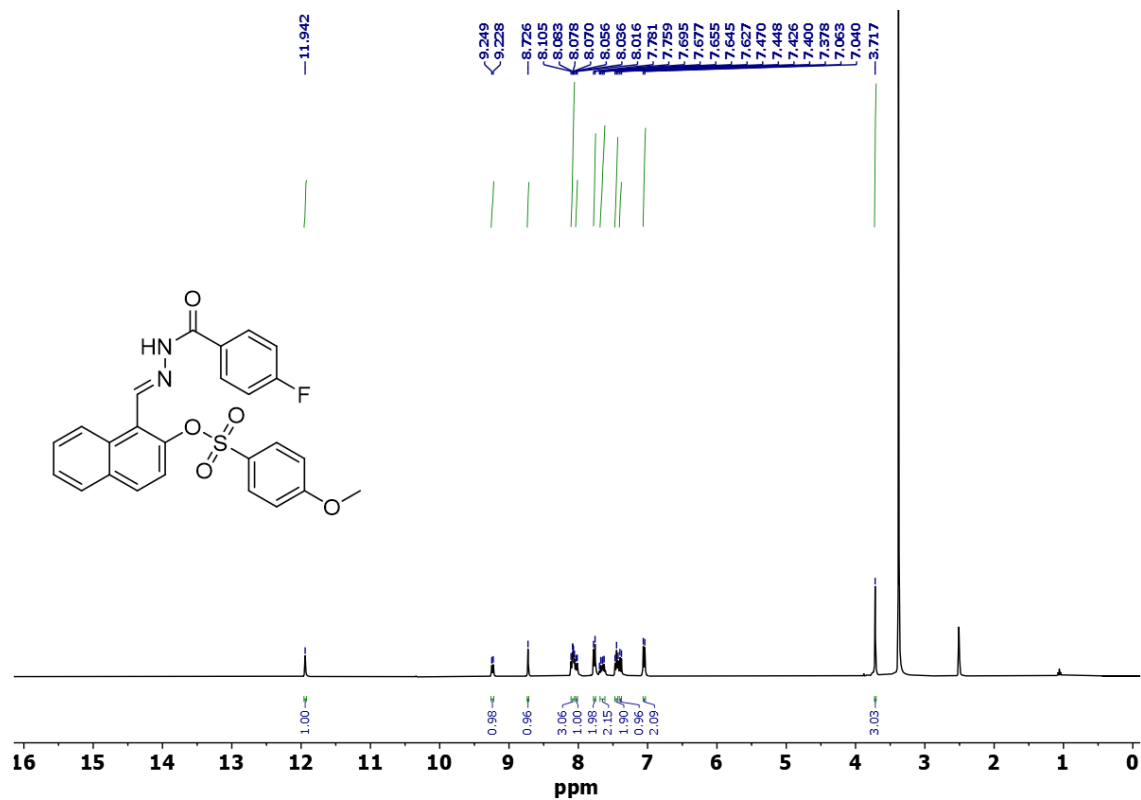
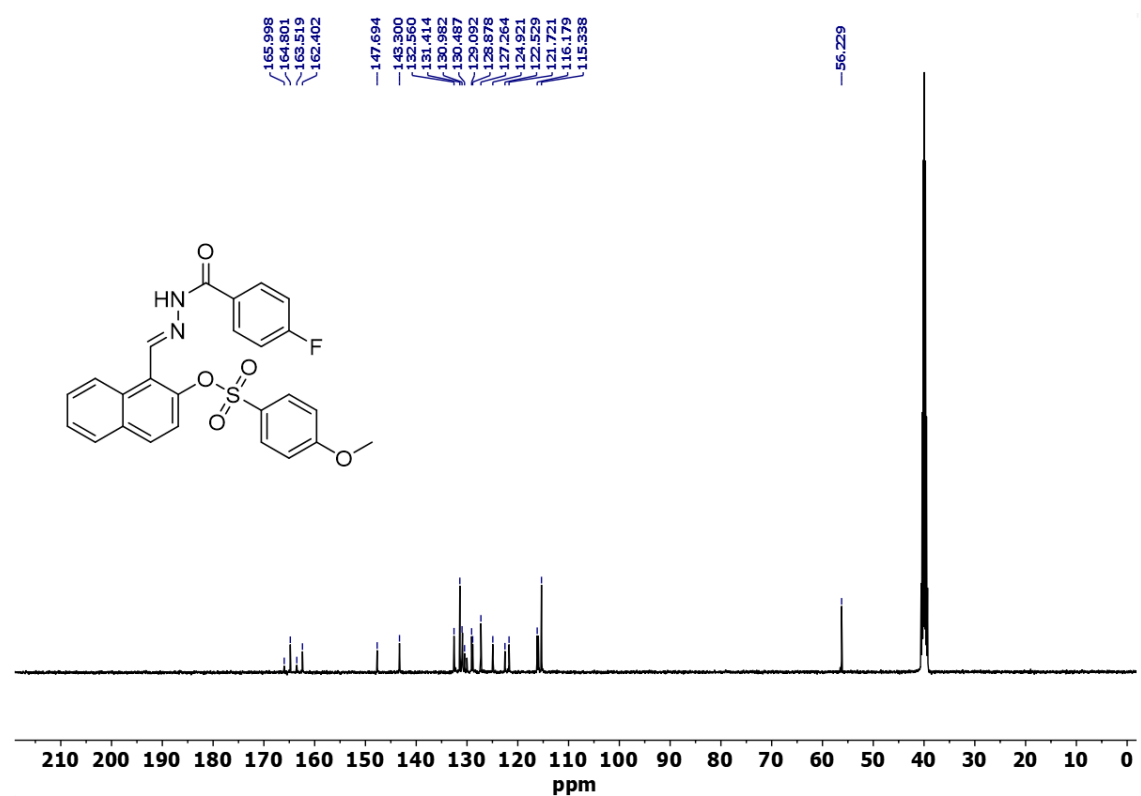
^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, ppm): δ 11.94 (s, 1H, -CONH), 9.24 (d, J = 8.5 Hz, 1H, aromatic protons), 8.73 (s, 1H, -CH=N), 8.11 – 8.05 (m, 3H, aromatic protons), 8.03 (d, J = 8.0 Hz, 1H, aromatik proton), 7.76 (s, 2H, aromatik protonlar), 7.69 – 7.62 (m, 2H, aromatik protonlar), 7.46 (d, J = 8.8 Hz, 2H, aromatik protonlar), 7.40 (s, 1H, aromatik proton), 7.05 (d, J = 8.9 Hz, 2H, aromatik protonlar), 3.72 (s, 3H, OCH₃). (Şekil 4.28).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz, ppm): 162.40 (C=O), 147.69 (C=N), 166.00, 164.80, 163.52, 143.30, 132.56, 131.41, 130.98, 130.49, 129.09, 128.88, 127.26, 124.92, 122.53, 121.72, 116.18, 115.34 (aromatik karbonlar), 56.23 (OCH₃). (Şekil 4.29).

Elemental analiz sonucu; C₂₅H₁₉FN₂O₅S için Hesaplanan(%): C, 62.75; H, 4.00; N, 5.85; S, 6.70. **Bulunan (%):** C, 62.79; H, 4.02; N, 5.79; S, 6.78.



Şekil 4.27. Bileşik 2g'nin FT-IR spektrumu

Şekil 14. Bileşik 2g'nin ¹H NMR spektrumuŞekil 4.29. Bileşik 2g'nin ¹³C NMR spektrumu

4.3. Biyolojik Aktivite Çalışmalarının Sonuçları

Kanser, glokoma ve Alzheimer günümüzde dünyada en sık görülen hastalıklar arasındadır. Bu hastalıkların tedavisinde kullanılan mevcut ilaçların hastalar üzerinde yeterli iyileştirici etki sağlayamaması, yeni inhibitörlerin tasarımı ve sentezi ihtiyacını doğurmaktadır (Mohamed ve ark., 2017; Özil ve ark., 2019). Bu çalışmada, yeni hidrazon bileşikler ve referans ilaçlar (asetazolamid; AZA) ve takrin), daha önce bildirilen yöntemler kullanılarak hCA I, hCA II, AChE ve BChE enzimlerine karşı inhibisyon özellikleri açısından test edildi. Sonuçlar Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Enzim inhibisyon sonuçları

Bileşikler	IC ₅₀ (nM)			
	hCA I	hCA II	AChE	BChE
2a	170 ± 3.40	156 ± 3.12	107.4 ± 2.15	114.3 ± 2.29
2b	145.5 ± 2.91	138.8 ± 2.78	89.5 ± 1.79	111.5 ± 2.23
2c	102.7 ± 2.05	97.4 ± 1.95	12.1 ± 0.24	83.6 ± 1.67
2d	148.8 ± 2.98	141.5 ± 2.83	91.9 ± 1.84	113.3 ± 2.27
2e	30.4 ± 0.61	23.2 ± 0.46	61.4 ± 1.23	76.4 ± 1.53
2f	121.5 ± 2.4	112.3 ± 2.25	83.7 ± 1.67	97.2 ± 1.94
2g	264.0 ± 5.28	251.6 ± 5.03	114.3 ± 2.29	134.0 ± 2.68
AZA^a	424.33	232.48	-	-
Tacrine^b	-	-	190.0	12.0

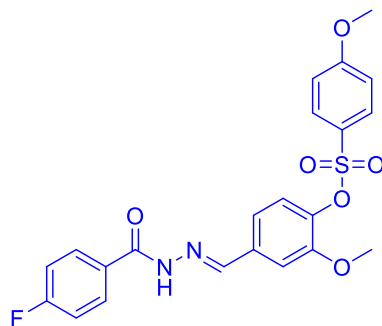
^aShirinzadeh ve Dilek, 2020.

^bBrus ve ark., 2014.

(i) Sitozolik izoform hCA I, diğerlerine kıyasla gastrointestinal sistemde ve kırmızı kan hücrelerinde oldukça bol miktarda bulunan bir enzimdir. Bu çalışmada hCA I testinde, test edilen yeni moleküller (**2a–g**), Tablo 4.1'de görüldüğü gibi bu enzime karşı 30.4 ila 264.0 nM aralığında aktivite gösterdi. Test edilen bütün moleküller, hCA I' enzimini AZA'dan daha fazla inhibe etti. Bunlar arasında, 4-((2-(4-florobenzoil)hidrazono)metil)-2-metoksifenil 4-metoksibenzensülfonat (**2e**) en aktif inhibitördü ve bu molekül, hCA I enzimini AZA'ya kıyasla, ondört kattan daha fazla inhibe etti. Ayrıca bileşik **2e**, AZA'ya kıyasla hCA II' enzime karşı en aktif inhibitördü. Bu enzim, hCA I ile birlikte gaz değişimi ve iyon taşınması gibi önemli metabolik fonksiyonlarda rol oynamaktadır.

Serideki bu aktif molekül dışında, 4-((2-(4-florobenzoil) hidrazono)metil)fenil 4-metoksibenzensülfonat (**2c**), AZA ile karşılaştırıldığında hem hCA I hem de hCA II enzimine karşı ikinci en aktif inhibitör olmuştur. hCA II testinde, test edilen hibrit moleküller, hCA II enzimine karşı farklı konsantrasyonlarda (23.2-251.6 nM) inhibisyon aktivitesine sahipti. İnhibisyon sonuçları, bileşik **2g** dışındaki hedef bileşiklerin bu enzimi AZA'ya kıyasla daha düşük nanomolar seviyelerde inhibe ettiğini gösterdi.

(ii) Bu çalışmada, yeni moleküllerin AChE ve BChE enzimlerine karşı inhibisyon aktiviteleri Ellman yöntemine göre belirlendi. Son yıllarda, Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan bazı güncel ilaçların hepatotoksisite ve gastrointestinal rahatsızlık gibi yan etkileri nedeniyle tedavi süreçlerindeki kullanımları sınırlandırılmıştır (Mehta ve ark., 2022; Arslan ve ark., 2022). Bu nedenle, bu hastalığın tedavisinde kullanılacak yeni ve spesifik AChE inhibitörlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmada, Tablo 4.1'de görüldüğü gibi bu yeni türevlerin (**2a-g**) takrine kıyasla AChE enzimini inhibe etme potansiyelinin daha yüksek olduğu belirlendi. AChE testinde, test edilen moleküller, 12.1 ila 114.3 nM arasında değişen IC₅₀ değerleriyle inhibisyon gösterdi. Seride bileşik **2c** (12.1 nM), takrine (190.0 nM) kıyasla bu enzime karşı en iyi inhibitördü. Bu bileşik, AChE enzimini takrine kıyasla onbeş kattan daha fazla inhibe etti. Bileşik **2c** dışında, bileşik **2e** (61.4 nM), bu enzime karşı ikinci en aktif inhibitördü. BChE testinde, test edilen bu moleküller, 76.4 ila 134.0 nM arasındaki konsantrasyonlarda BChE enzimine karşı aktivite gösterdi. Bu sonuçlara göre, test edilen moleküllerin hiçbiri referans ilaç kadar aktivite gösteremedi. Bu bileşikler arasında, bileşik **2c** (83.6 nM) ve **2e** (76.4 nM), takrine (12.0 nM) en yakın aktiviteyi gösterdi. Öte yandan, bileşik **2g**'nin hem BChE hem de diğer enzimlerine karşı daha düşük inhibisyon gösterdiği belirlendi.



Şekil 4.30. hCA I ve AChE karşı en iyi aktivite gösteren bileşiğin (**2e**) yapısı

Bu çalışmada, aromatik halkaların para konumunda bir hidroksil grubu taşıyan 4-hidroksibenzaldehyit ve 4-hidroksi-3-metoksibenzaldehyitten başlayarak sentezlenen

bileşik **2c** ve **2e** bu enzimlere karşı en iyi aktiviteyi gösterdi. Diğer moleküllerle karşılaştırıldığında, bu moleküllerin geometrilerinin hCA I ve AChE enzimlerinin aktif bölgeleriyle daha fazla etkileşime girmesi nedeniyle bu enzimleri daha iyi inhibe ettiği düşünülmektedir. Öte yandan, bu iki inhibitörün ana iskeleti aynı olmasına rağmen bu enzimlere karşı etkinliklerinde farklılıklar bulunmaktadır. Bunun 4-hidroksi-3-metoksibenzaldehitin yapısındaki elektron verici metoksi grubundan kaynaklandığını düşünülmektedir. Bu çalışmada, test edilen hibrit moleküller Tablo 4.2’de görüldüğü gibi başta hCA I ve AChE enzimleri olmak üzere bütün enzimleri nanomolar seviyelerde inhibe etti. Literatürde, bu enzimlere karşı en iyi inhibisyonu elde etmek amacıyla yapılan çalışmalarda farklı fonksiyonel gruplar içeren yeni hibrit moleküllerin kullanıldığı görülmektedir.

Tezin bu kısmında, bu çalışmanın inhibisyon sonuçları, hCA I enzimi için bazı sülfonamit türevlerinin ve AChE enzimi için hidrazon kısımları içeren bazı yeni hibrit moleküllerin inhibisyon sonuçlarıyla karşılaştırıldı. Bu çalışmalarda, hCA I ve AChE enzimlerinin mikromolar veya nanomolar konsantrasyonlarda inhibe edildiği belirlenmiştir (Tablo 4. 2). Çalışma sonuçları karşılaştırıldığında, sentezlenen bu yeni moleküllerin bu enzimlere karşı diğer çalışmalarda test edilen bazı moleküllere göre daha aktif olduğu belirlendi.

Tablo 4.2. Bazı sülfonamit ve hidrazon türevlerinin hCA I ve AChE enzimlerine karşı inhibisyon profillerinin karşılaştırılması.

Test edilen moleküller	İnhibisyon aralığı (IC ₅₀)	Enzim	Kaynaklar
Hidrazon	30.4 - 264.0 nM	hCA I	Bu çalışma
Sülfonamit	2.62–136.54 nM	hCA I	Gokcen ve ark., 2016.
Sülfonamit	55.14 - 562.62 nM	hCA I	Köksal ve ark., 2019.
Sülfonamit	4.90 - 96.0 nM	hCA I	Mohamed ve ark., 2017.
Sülfonamit	0.35–1.34 µM	hCA I	Kılıçaslan ve ark., 2016.
Sülfonamit	3.43 – 5.41 µM	hCA I	Göcer ve ark., 2017.
Hidrazon	12.1 - 114.3 nM	AChE	Bu çalışma
Hidrazon	11.33 – 216.47 µM	AChE	Coşar ve ark., 2022.
Hidrazon	10.39 – 76. 35 µM	AChE	Demirci ve ark., 2023
Hidrazon	4.32 – 10.12 µM	AChE	Parlar ve ark., 2023.
Hidrazon	168.16 – 872.51 µM	AChE	Esmer ve ark., 2022.
Hidrazon	60.14 – 84.81 µM	AChE	Başaran, 2023.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Günümüzde bazı kronik ve nörodejeneratif hastalıklar esteraz enzimleriyle ilişkilidir. Bu hastalıkların tedavi sürecinde kullanılan ilaçların arzulanan etkinliğe sahip olmaması ve kullanımlarına bağlı olarak tedavi sürecinde bazı yan etkilerinin ortaya çıkması nedeniyle yeni ve güçlü inhibitör adaylarına ihtiyaç olduğu açıktır. Bu amaçla, bu çalışmada bu enzimlerin yeni inhibitör adaylarını keşfetmek için yeni hibrit moleküller tasarladık ve sentezledik. Bu çalışmada, iki basamakta yüksek verimle hazırlanan yeni hibrit moleküller spektroskopik olarak karakterize edildi ve in vitro inhibisyon aktiviteleri açısından değerlendirildi. Test edilen bu moleküller arasında, bileşik **2c** ve **2e**'nin bu enzimlere karşı en aktif inhibitör adayları oldukları belirlendi. Bu yeni moleküllerin tamamı, hCA I ve AChE enzimlerini referans ilaçlara göre daha fazla inhibe etti. Bileşik **2g** hariç, test edilen moleküllerin tümü, hCA II enzimini AZA'dan daha düşük nanomolar konsantrasyonlarda inhibe etti. Buna karşın, yeni sentezlenen bileşikler BChE enzimini takrine daha zayıf inhibisyon gösterdi. Ayrıca, bileşik **2g**'nin bu enzimlere karşı serinin en zayıf inhibitörü olduğu belirlendi. Sonuç olarak, bu sonuçların yeni karbonik anhidraz ve kolinesteraz inhibitörlerinin sentezinde faydalı olabileceğine inanılmaktadır.

5.2. Öneriler

Bu çalışmada, bir aril sülfonat kısmına sahip yedi yeni hidrazon türevi ilk kez sentezlendi. Test edilen bu moleküllerin nanomolar seviyelerde bu metabolik enzimleri inhibe ettiği belirlendi. Bu bileşikler arasında, bazı bileşiklerin (**2c** ve **2e**) bu enzimlere karşı en aktif inhibitör adayları oldukları belirlendi. Bu bilgiler ışığında, özellikle bu iki molekül referans alınarak farklı elektron verici ve elektron alıcı gruplara sahip yeni türevleri sentezlenerek bu esteraz enzimleri ve diğer esteraz enzimlerine karşı inhibisyon çalışmalarının yapılmasını öneririz. Ayrıca, bu bileşiklerin biyolojik öneminin tam olarak belirlenmesi için, antioksidan, antikanser ve diğer biyolojik aktivite çalışmalarının yapılması durumunda iyi sonuçlar alınacağı ümidini taşımaktayız.

6. KAYNAKLAR

- Alper Türkoğlu, E., Şentürk, M., Supuran, C. T., Ekinçi, D. (2017). Carbonic anhydrase inhibitory properties of some uracil derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 74-77.
- Alterio, V., Di Fiore, A., D'Ambrosio, K., Supuran, C. T., De Simone, G. (2012). Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms?. *Chemical Reviews*, 112(8), 4421-4468.
- Arslan, T., Senturk, M., Karagoz, L., Karagoz, Y., Ekinçi, D., Efe, A., Uras, F. (2022). Synthesis, in vitro and in silico Biological Studies of Sulfonamide Chalcones as Esterase Inhibitors. *ChemistrySelect*, 7(44), e202202993.
- Balaydın, H. T., Şentürk, M., Menzek, A. (2012). Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of novel cyclohexanonyl bromophenol derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(3), 1352-1357.
- Başaran, E. (2023). Schiff Base Derivatives Based on Ampyrone as Promising Acetylcholinesterase Inhibitors: Synthesis, Spectral Characterization, Biological Activity, and SwissADME Predictions. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 49(1), 114-126.
- Başaran, E. (2023). Synthesis, antioxidant, and anticholinesterase activities of novel N-arylsulfonyl hydrazones bearing sulfonate ester scaffold. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 70(7), 1580-1590.
- Başaran, E., Çakmak, R., Akkoc, S., Kaya, S. (2022). Combined experimental and theoretical analyses on design, synthesis, characterization, and in vitro cytotoxic activity evaluation of some novel imino derivatives containing pyrazolone ring. *Journal of Molecular Structure*, 1265, 133427.
- Başaran, E., Çakmak, R., Şentürk, M., Taskin-Tok, T. (2022). Biological activity and molecular docking studies of some N-phenylsulfonamides against cholinesterases and carbonic anhydrase isoenzymes. *Journal of Molecular Recognition*, 35(10), e2982.
- Başaran, E., Haşimi, N., Çakmak, R., Çınar, E. (2022). Synthesis, structural characterization, and biological evaluation of some hydrazone compounds as potential antioxidant agents. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 48(1), 143-152.
- Boztas, M., Cetinkaya, Y., Topal, M., Gulcin, I., Menzek, A., Sahin, Tanc, M., Supuran, C. T. (2015). Synthesis and carbonic anhydrase isoenzymes I, II, IX, and XII inhibitory effects of dimethoxybromophenol derivatives incorporating cyclopropane moieties. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(2), 640-650.
- Brus, B., Kosak, U., Turk, S., Pislari, A., Coquelle, N., Kos, J., Stojan, J., Colletier, J.-P., Gobec, S. (2014). Discovery, biological evaluation, and crystal structure of a

- novel nanomolar selective butyrylcholinesterase inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(19), 8167-8179.
- Cavdar, H., Senturk, M., Guney, M., Durdagi, S., Kayik, G., Supuran, C. T., Ekinici, D. (2019). Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase with uracil derivatives: kinetic and computational studies. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34(1), 429-437.
- Chun, M. R., Mayeux, R. (1994). Alzheimer's disease. *Current Opinion in Neurology*, 7(4), 299-304.
- Classics Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7(2), 88-95.
- Coşar, E. D., Dincel, E. D., Demiray, S., Sucularlı, E., Tüccaroğlu, E., Özsoy, N., Ulusoy-Güzeldemirci, N. (2022). Anticholinesterase activities of novel indole-based hydrazide-hydrazone derivatives: Design, synthesis, biological evaluation, molecular docking study and in silico ADME prediction. *Journal of Molecular Structure*, 1247, 131398.
- Çakmak, R. (2022). Synthesis and in vitro human carbonic anhydrase I and II inhibition properties of some novel hydrazone compounds containing an aryl sulfonate moiety. *Erzincan University Journal of Science and Technology*, 15(2), 659-669.
- Çakmak, R., Başaran, E., Kaya, S., Erkan, S. (2022). Synthesis, spectral characterization, chemical reactivity and anticancer behaviors of some novel hydrazone derivatives: Experimental and theoretical insights. *Journal of Molecular Structure*, 1253, 132224.
- Çakmak, R., Başaran, E., Şentürk, M. (2022). Synthesis, characterization, and biological evaluation of some novel Schiff bases as potential metabolic enzyme inhibitors. *Archiv der Pharmazie*, 355(4), 2100430.
- Demirci, Y., Kalay, E., Kara, Y., Güler, H. İ., Can, Z., Şahin, E. (2023). Synthesis of arylsulfonyl hydrazone derivatives: antioxidant activity, acetylcholinesterase inhibition properties, and molecular docking study. *ChemistrySelect*, 8(29), e202301474.
- Demirdağ, R., Çomaklı, V., Şentürk, M., Ekinici, D., Küfrevioğlu, Ö. İ., Supuran, C. T. (2013). Purification and characterization of carbonic anhydrase from sheep kidney and effects of sulfonamides on enzyme activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(6), 1522-1525.
- Devi, G. (2023). A how-to guide for a precision medicine approach to the diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 15, 1213968.
- Dezonne, R. S., Pereira, C. M., de Moraes Martins, C. J., de Abreu, V. G., Francischetti, E. A. (2023). Adiponectin, the adiponectin paradox, and Alzheimer's Disease: Is this association biologically plausible?. *Metabolic Brain Disease*, 38(1), 109-121.

- Dizdaroglu, Y., Albay, C., Arslan, T., Ece, A., Turkoglu, E. A., Efe, A., Şemtük, M., Supuran, C. T., Ekinci, D. (2020). Design, synthesis and molecular modelling studies of some pyrazole derivatives as carbonic anhydrase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35(1), 289-297.
- Duhan, M., Sindhu, J., Kumar, P., Devi, M., Singh, R., Kumar, Lal, S., Kumar, A., Kumar, S., Hussain, K. (2022). Quantitative structure activity relationship studies of novel hydrazone derivatives as α -amylase inhibitors with index of ideality of correlation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 40(11), 4933-4953.
- Durgun, M., Turkmen, H., Ceruso, M., Supuran, C. T. (2015). Synthesis of Schiff base derivatives of 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonamide with inhibitory activity against carbonic anhydrase isoforms I, II, IX and XII. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(11), 2377-2381.
- Edvardsson, D., Winblad, B., Sandman, P. O. (2008). Person-centred care of people with severe Alzheimer's disease: current status and ways forward. *The Lancet Neurology*, 7(4), 362-367.
- El-Malah, A., Taher, E. S., Angeli, A., Elbaramawi, S. S., Mahmoud, Z., Moustafa, N., Supuran, C. T., Ibrahim, T. S. (2023). Schiff bases as linker in the development of quinoline-sulfonamide hybrids as selective cancer-associated carbonic anhydrase isoforms IX/XII inhibitors: A new regioisomerism tactic. *Bioorganic Chemistry*, 131, 106309.
- Esmer, Y. İ., Çınar, E., Başaran, E. (2022). Design, docking, synthesis and biological evaluation of novel nicotinohydrazone derivatives as potential butyrylcholinesterase enzyme inhibitor. *ChemistrySelect*, 7(33), e202202771.
- Geula, C., Mesulam, M. M. (1989). Cortical cholinergic fibers in aging and Alzheimer's disease: a morphometric study. *Neuroscience*, 33(3), 469-481.
- Gokcen, T., Gulcin, I., Ozturk, T., Goren, A. C. (2016). A class of sulfonamides as carbonic anhydrase I and II inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31, 180-188.
- Göcer, H., Akıncioğlu, A., Göksu, S., Gülçin, İ. (2017). Carbonic anhydrase inhibitory properties of phenolic sulfonamides derived from dopamine related compounds. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(3), 398-402.
- Güney, M., Çavdar, H., Şentürk, M., Ekinci, D. (2015). Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of novel uracil derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(16), 3261-3263.
- Güney, M., Çavdar, H., Şentürk, M., Ekinci, D. (2015). Synthesis and carbonic anhydrase inhibitory properties of novel uracil derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(16), 3261-3263.
- Heidelberger, C., Chaudhuri, N. K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R. J., Scheiner, J. (1957). Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature*, 179(4561), 663-666.

- Irish, M., Piolino, P. (2016). Impaired capacity for prospection in the dementias—Theoretical and clinical implications. *British Journal of Clinical Psychology*, 55(1), 49-68.
- Işık, S., Vullo, D., Durdagi, S., Ekinçi, D., Şentürk, M., Çetin, A., Şentürk, E., Supuran, C. T. (2015). Interaction of carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with some pyridine and phenol hydrazinecarbothioamide derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(23), 5636-5641.
- Işık, S., Vullo, D., Durdagi, S., Ekinçi, D., Şentürk, M., Çetin, A., Şentürk, E., Supuran, C. T. (2015). Interaction of carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with some pyridine and phenol hydrazinecarbothioamide derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(23), 5636-5641.
- Jaberi, S., Fahnestock, M. (2023). Mechanisms of the Beneficial Effects of Exercise on Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression in Alzheimer's Disease. *Biomolecules*, 13(11), 1577.
- Kamalı, A., Çakmak, R., Boğa, M. (2022). Anticholinesterase and antioxidant activities of novel heterocyclic Schiff base derivatives containing an aryl sulfonate moiety. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 69(4), 731-743.
- Katzman, R., Saitoh, T. (1991). Advances in Alzheimer's disease. *The FASEB Journal*, 5(3), 278-286.
- Khera, R. A., Hussain, M., Ahmad, R., Saeed, A., Villinger, A., Fischer, C., Langer, P. (2010). Synthesis of fluorinated 2, 3-dihydropyran-4-ones by cyclocondensation of 1, 3-dicarbonyl dianions with aldehydes. *Journal of Fluorine Chemistry*, 131(9), 892-897.
- Kılıcaslan, S., Arslan, M., Ruya, Z., Bilen, Ç., Ergün, A., Gençer, N., Arslan, O. (2016). Synthesis and evaluation of sulfonamide-bearing thiazole as carbonic anhydrase isoforms hCA I and hCA II. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(6), 1300-1305.
- Köksal, Z., Alım, Z., Bayrak, S., Gülçin, İ., Özdemir, H. (2019). Investigation of the effects of some sulfonamides on acetylcholinesterase and carbonic anhydrase enzymes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 33(5), e22300.
- Li, Q., Yang, X., Xu, J., Guo, Y., He, X., Hu, Lyu, T., Marra, D., Miller, A., Smith, G., DeKosky, S., Boyce, R. D., Schliep, K., Shenkman, E., Maraganore, D., Wu, Y., Bian, J. (2023). Early prediction of Alzheimer's disease and related dementias using real-world electronic health records. *Alzheimer's & Dementia*. 2023, 19, 3506-3518.
- Lineweaver, H., Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56(3), 658-666.
- Mathew, S., Abraham, T. E., Zakaria, Z. A. (2015). Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 5790-5798.

- Mehta, M., Adem, A., Sabbagh, M. (2012). New acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2012.
- Metwally, K., Khalil, A., Sallam, A., Pratsinis, H., Kletsas, D., El Sayed, K. (2013). Structure–activity relationship investigation of methoxy substitution on anticancer pyrimido [4, 5-c] quinolin-1 (2 H)-ones. *Medicinal Chemistry Research*, 22, 4481-4491.
- Mohamed, M. A., Abdel-Aziz, A. A.-M., Sakr, H. M., El-Azab, A. S., Bua, S., Supuran, C. T. (2017). Synthesis and human/bacterial carbonic anhydrase inhibition with a series of sulfonamides incorporating phthalimido moieties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(8), 2524-2529.
- Murali Doraiswamy, P. (2002). Non-cholinergic strategies for treating and preventing Alzheimer's disease. *CNS drugs*, 16, 811-824.
- Musial, A., Bajda, M., Malawska, B. (2007). Recent developments in cholinesterases inhibitors for Alzheimer's disease treatment. *Current Medicinal Chemistry*, 14(25), 2654-2679.
- Orta-Salazar, E., Cuellar-Lemus, C. A., Díaz-Cintra, S., Feria-Velasco, A. I. (2014). Cholinergic markers in the cortex and hippocampus of some animal species and their correlation to Alzheimer's disease. *Neurología (English Edition)*, 29(8), 497-503.
- Özil, M., Balaydın, H. T., Şentürk, M. (2019). Synthesis of 5-methyl-2, 4-dihydro-3H-1, 2, 4-triazole-3-one's aryl Schiff base derivatives and investigation of carbonic anhydrase and cholinesterase (AChE, BuChE) inhibitory properties. *Bioorganic Chemistry*, 86, 705-713.
- Özil, M., Balaydın, H. T., Şentürk, M. (2019). Synthesis of 5-methyl-2, 4-dihydro-3H-1, 2, 4-triazole-3-one's aryl Schiff base derivatives and investigation of carbonic anhydrase and cholinesterase (AChE, BuChE) inhibitory properties. *Bioorganic Chemistry*, 86, 705-713.
- Parlar, S., Sayar, G., Tarikogullari, A. H., Karadagli, S. S., Alan, E., Sevin, G., Erciyas, E., Holzgrabe, U., Alptuzun, V. (2023). N-Substituted piperidine-3-carbohydrazide-hydrazones against Alzheimer's disease: Synthesis and evaluation of cholinesterase, beta-amyloid inhibitory activity, and antioxidant capacity. *Archiv der Pharmazie*, 356(3), 2200519.
- Penke, B., Szűcs, M., Bogár, F. (2023). New Pathways Identify Novel Drug Targets for the Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5383.
- Perfetto, R., Del Prete, S., Vullo, D., Sansone, G., Barone, C., Rossi, M., Supuran, C. T., Capasso, C. (2017). Biochemical characterization of the native α -carbonic anhydrase purified from the mantle of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 632-639.

- Pietruś, W., Kurczab, R., Warszycki, D., Bojarski, A. J., Bajorath, J. (2023). Isomeric Activity Cliffs—A Case Study for Fluorine Substitution of Aminergic G Protein-Coupled Receptor Ligands. *Molecules*, 28(2), 490.
- Popiołek, Ł., Biernasiuk, A., Berecka, A., Gumieniczek, A., Malm, A., Wujec, M. (2018). New hydrazide–hydrazones of isonicotinic acid: Synthesis, lipophilicity and in vitro antimicrobial screening. *Chemical Biology & Drug Design*, 91(4), 915-923.
- Purser, S., Moore, P. R., Swallow, S., Gouverneur, V. (2008). Fluorine in medicinal chemistry. *Chemical Society Reviews*, 37(2), 320-330.
- Scheibelberger, L., Stankovic, T., Liepert, K., Kienzle, A., Patronas, E. M., Balber, T., Mitterhauser, M., Haschemi, A., Pallitsch, K. (2023). Fluorinated Analogues to the Pentuloses of the Pentose Phosphate Pathway. *European Journal of Organic Chemistry*, 26(31), e202300339.
- Shirinzadeh, H., Dilek, E. (2020). Synthesis, characterization and biological activity evaluation of novel naphthalenylmethylen hydrazine derivatives as carbonic anhydrase inhibitors. *Journal of Molecular Structure*, 1220, 128657.
- Sundaram, V., Rumbolo, P., Grubb, J. Strisciuglio, P., PSly, W. S. (1986). Carbonic anhydrase II deficiency: diagnosis and carrier detection using differential enzyme inhibition and inactivation. *American Journal of Human Genetics*, 38(2), 125.
- Todeschini, A. R., de Miranda, A. L. P., da Silva, K. C. M., Parrini, S. C., Barreiro, E. J. (1998). Synthesis and evaluation of analgesic, antiinflammatory and antiplatelet properties of new 2-pyridylarylhydrazone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 33(3), 189-199.
- Trejo-Lopez, J. A. , Yachnis, A. T. , Prokop, S. (2022). Neuropathology of Alzheimer's Disease. *Neurotherapeutics*, 19, 173-185.
- Tzioras, M., McGeachan, R.I., Durrant, C.S., Spires-Jones, T. L. (2023). Synaptic degeneration in Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 19(1), 19-8.
- Valls-Comamala, V., Guivernau, B., Bonet, J., Puig, M., Perálvarez-Marín, A., Palomer, E., Fernández-Busquets, X., Altafaj, X., Tajés, M., Puig-Pijoan, A., Vicente, R., Oliva, B., Muñoz, F. J. (2017). The antigen-binding fragment of human gamma immunoglobulin prevents amyloid β -peptide folding into β -sheet to form oligomers. *Oncotarget*, 8(25), 41154.
- Verpoorte, J. A., Mehta, S., Edsall, J. T. (1967). Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C. *Journal of Biological Chemistry*, 242(18), 4221-4229.
- Villarroya, M., Garcia, A. G., Marco, J. L. (2004). New classes of AChE inhibitors with additional pharmacological effects of interest for the treatment of Alzheimer's disease. *Current Pharmaceutical Design*, 10(25), 3177-3184.
- Yan, L., Muller, C. E.(2004). Preparation, properties, reactions, and adenosine receptor affinities of sulfophenylxanthine nitrophenyl esters: toward the development of

- sulfonic acid prodrugs with peroral bioavailability. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47, 1031-1041.
- Yaseen, R., Ekinici, D., Senturk, M., Hameed, A. D., Ovais, S., Rathore, P., Samim, M., Javed, K., Supuran, C. T. (2016). Pyridazinone substituted benzenesulfonamides as potent carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(4), 1337-1341.
- Yaseen, R., Ekinici, D., Senturk, M., Hameed, A. D., Ovais, S., Rathore, P., Samim, M., Javed, K., Supuran, C. T. (2016). Pyridazinone substituted benzenesulfonamides as potent carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(4), 1337-1341.
- Zhang, B., Zhao, Y. F., Zhai, X., Fan, W. J., Ren, J. L., Wu, C. F., Gong, P. (2012). Design, synthesis and antiproliferative activities of diaryl urea derivatives bearing N-acylhydrazone moiety. *Chinese Chemical Letters*, 23(8), 915-918.
- Zilbeyaz, K., Stellenboom, N., Guney, M., Oztekin, A., Senturk, M. (2018). Effects of aryl methanesulfonate derivatives on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 32(11), e22210.
- Zuse, A., Schmidt, P., Baasner, S., Böhm, K. J., Müller, K., Gerlach, M., . Günther, E. G., Unger, E., Prinz, H. (2007). Sulfonate derivatives of naphtho [2, 3-b] thiophen-4 (9 H)-one and 9 (10 H)-anthracenone as highly active antimicrotubule agents. Synthesis, antiproliferative activity, and inhibition of tubulin polymerization. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50(24), 6059-6066.